Über dieses Buch

Dies ist ein digitales Exemplar eines Buches, das seit Generationen in den Regalen der Bibliotheken aufbewahrt wurde, bevor es von Google im Rahmen eines Projekts, mit dem die Bücher dieser Welt online verfügbar gemacht werden sollen, sorgfältig gescannt wurde.

Das Buch hat das Urheberrecht überdauert und kann nun öffentlich zugänglich gemacht werden. Ein öffentlich zugängliches Buch ist ein Buch, das niemals Urheberrechten unterlag oder bei dem die Schutzfrist des Urheberrechts abgelaufen ist. Ob ein Buch öffentlich zugänglich ist, kann von Land zu Land unterschiedlich sein. Öffentlich zugängliche Bücher sind unser Tor zur Vergangenheit und stellen ein geschichtliches, kulturelles und wissenschaftliches Vermögen dar, das häufig nur schwierig zu entdecken ist.

Gebrauchsspuren, Anmerkungen und andere Randbemerkungen, die im Originalband enthalten sind, finden sich auch in dieser Datei – eine Erinnerung an die lange Reise, die das Buch vom Verleger zu einer Bibliothek und weiter zu Ihnen hinter sich gebracht hat.

Nutzungsrichtlinien

Google ist stolz, mit Bibliotheken in partnerschaftlicher Zusammenarbeit öffentlich zugängliches Material zu digitalisieren und einer breiten Masse zugänglich zu machen. Öffentlich zugängliche Bücher gehören der Öffentlichkeit, und wir sind nur ihre Hüter. Nichtsdestotrotz ist diese Arbeit kostspielig. Um diese Ressource weiterhin zur Verfügung stellen zu können, haben wir Schritte unternommen, um den Missbrauch durch kommerzielle Parteien zu verhindern. Dazu gehören technische Einschränkungen für automatisierte Abfragen.

Wir bitten Sie um Einhaltung folgender Richtlinien:

+ *Nutzung der Dateien zu nichtkommerziellen Zwecken* Wir haben Google Buchsuche für Endanwender konzipiert und möchten, dass Sie diese Dateien nur für persönliche, nichtkommerzielle Zwecke verwenden.

+ *Keine automatisierten Abfragen* Senden Sie keine automatisierten Abfragen irgendwelcher Art an das Google-System. Wenn Sie Recherchen über maschinelle Übersetzung, optische Zeichenerkennung oder andere Bereiche durchführen, in denen der Zugang zu Text in großen Mengen nützlich ist, wenden Sie sich bitte an uns. Wir fördern die Nutzung des öffentlich zugänglichen Materials für diese Zwecke und können Ihnen unter Umständen helfen.

+ *Beibehaltung von Google-Markenelementen* Das "Wasserzeichen" von Google, das Sie in jeder Datei finden, ist wichtig zur Information über dieses Projekt und hilft den Anwendern weiteres Material über Google Buchsuche zu finden. Bitte entfernen Sie das Wasserzeichen nicht.

+ *Bewegen Sie sich innerhalb der Legalität* Unabhängig von Ihrem Verwendungszweck müssen Sie sich Ihrer Verantwortung bewusst sein, sicherzustellen, dass Ihre Nutzung legal ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass ein Buch, das nach unserem Dafürhalten für Nutzer in den USA öffentlich zugänglich ist, auch für Nutzer in anderen Ländern öffentlich zugänglich ist. Ob ein Buch noch dem Urheberrecht unterliegt, ist von Land zu Land verschieden. Wir können keine Beratung leisten, ob eine bestimmte Nutzung eines bestimmten Buches gesetzlich zulässig ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass das Erscheinen eines Buchs in Google Buchsuche bedeutet, dass es in jeder Form und überall auf der Welt verwendet werden kann. Eine Urheberrechtsverletzung kann schwerwiegende Folgen haben.

Über Google Buchsuche

Das Ziel von Google besteht darin, die weltweiten Informationen zu organisieren und allgemein nutzbar und zugänglich zu machen. Google Buchsuche hilft Lesern dabei, die Bücher dieser Welt zu entdecken, und unterstützt Autoren und Verleger dabei, neue Zielgruppen zu erreichen. Den gesamten Buchtext können Sie im Internet unter `http://books.google.com` durchsuchen.

UC-NRLF
B 3 778 042

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
SAN FRANCISCO MEDICAL CENTER
LIBRARY

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Biochemische Zeitschrift

Beiträge
zur chemischen Physiologie und Pathologie

Herausgegeben von

F. Hofmeister-Würzburg, C. von Noorden-Frankfurt a. M.,
E. Salkowski-Berlin, A. von Wassermann-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, J. Feigl-Hamburg, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin-Dahlem, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, F. Haber-Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger-Groningen, P. Hári-Budapest, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, A. Koch-Göttingen, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Greifswald, L. Michaelis-Berlin, H. Molisch-Wien, J. Morgenroth-Berlin, E. Münzer-Prag, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, P. Rona-Berlin, S. Saaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., A. Stutzer-Königsberg i. Pr., H. v. Tappeiner-München, H. Thoms-Berlin, P. Trendelenburg-Rostock, A. J. J. Vandevelde-Gent, O. Warburg-Berlin, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin

Hundertundvierter Band

Berlin
Verlag von Julius Springer
1920

Digitized by Google

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig

Digitized by Google

Inhaltsverzeichnis.

Seite

v. **Hoefft, Franz.** Calorimetrische Untersuchungen an Melaninen . 1

Russnyák, Stefan. Chinin und Blut. I. Mitteilung. Ein Beitrag zur Pathogenese des Schwarzwasserfiebers 9

Iversen, Poul. Untersuchungen über die titrimetrische Phosphorsäurebestimmung nach Neumann 15

— — Zur Bestimmung des Phosphorgehalts kleinerer Mengen von Blut und Plasma 22

Lüers, Heinrich. Studien über die Reifung der Cerealien . . . 30

Fex, Johan. Chemische und morphologische Studien über das Cholesterin und die Cholesterinester in normalen und pathologisch veränderten Organen 82

Adolf, Mona und **Spiegel, Ernst.** Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide. XXIII. Das Acidalbumin 175

Wagner, Richard. Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide. XXIV. Die Fällung von Eiweiß durch Säuren und Laugen 190

Němec, Antonin und **Strañák, František.** Beitrag zur Kenntnis des toxischen Einflusses der Terpene auf die höheren Pflanzen 200

Murschhauser, Hans. Das optische Drehungsvermögen der Dextrose unter dem Einfluß von Salz- und Schwefelsäure. I. Mitteilung 214

Polányi, M. Studien über Leitfähigkeitserniedrigung und Adsorption durch lyophile Kolloide 237

Mándoki, L. und **Polányi, M.** Ursachen der Leitfähigkeit von Caseinlösungen 254

Koritschoner, Robert und **Morgenstern, Otto.** Refraktometrische Untersuchungen über die Reaktionen zwischen isolierten Krebszellen und Blutserum (Freund-Kaminersche Reaktionen). I. Mitteilung 259

Landsteiner, Karl. Spezifische Serumreaktionen mit einfach zusammengesetzten Substanzen von bekannter Konstitution (organischen Säuren). XIV. Mitteilung über Antigene und serologische Spezifität 280

Krogh, A. und **Liljestrand, G.** Eine Mikromethode zur Bestimmung der Kohlensäure des Blutes 300

Jacoby, Martin. Über künstliche Zymogene 316

Autorenverzeichnis 323

Digitized by Google

Digitized by Google

Calorimetrische Untersuchungen an Melaninen.

Von

Franz v. Hoefft.

(Aus der chemischen Abteilung des Physiologischen Instituts der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 18. Dezember 1919.)

Die von Otto v. Fürth im Jahre 1901 ausgesprochene Meinung, derzufolge die Bildung der natürlich vorkommenden melanotischen Pigmente auf die Einwirkung oxydativer Fermente auf cyclische, dem Eiweißmolekül entstammende Chromogene zu beziehen sei, hat im Laufe von zwei Dezennien vielfachen Nachprüfungen standgehalten und dürfte gegenwärtig ziemlich allgemein angenommen sein. Man ist heute berechtigt festzustellen, daß die melanotischen Farbstoffe dem Zusammenwirken von zweierlei fermentativen Vorgängen ihre Entstehung verdanken: Durch die Wirkung eiweißspaltender Fermente werden cyclische Komplexe aus dem Protoplasma-Eiweiß abgespalten, und diese unterliegen sodann der Oxydation durch oxydative Fermente, wobei schließlich hochmolekulare Kondensationsprodukte von dunkler Färbung zustande kommen. Zahlreiche Untersuchungen gerade aus den letzten Jahren, so insbesondere diejenigen von Neuberg, Bloch, Batteli und Stern, Bach, Chodat, Gortner, H. Przibram und ihren Mitarbeitern, stehen mit dieser Auffassung im besten Einklange[1]).

[1]) Bezüglich der umfangreichen Literatur dieses Gegenstandes verweise ich auf die zusammenfassenden Darstellungen von O. v. Fürth: 1. Vergleichende chemische Physiologie der niederen Tiere. Jena 1908. S. 93, 368, 528. 2. Sammelreferat: Centralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **15**, 617—641. 1904. 3. Artikel im Handbuch der Biochemie von Oppenheimer **1**, 744—749. 1907. 4. Probleme der physiol. und pathol. Chemie **1**, 522—539 Jena 1912. 5. Neuere Forschung über die Physiologie und Pathologie melanotischer Pigmente, Wiener med. Wochenschr. 1920 Nr. 5 und 6.

Digitized by Google

Was die Natur der hier in Betracht kommenden cyclischen Komplexe betrifft, darf die Beteiligung des Tyrosins als sichergestellt, diejenige des Tryptophans zum mindesten als sehr wahrscheinlich gelten. Als allgemeines Bild ergibt sich, daß die verschiedenen schwarzen, als „Melanine" bezeichneten Farbstoffe eine ganze Welt für sich bilden. Es gibt ebensowenig ein Melanin, als es ein Pepton oder ein Dextrin gibt. Vielmehr liegen große Reihen von Kondensationsprodukten von sehr verschiedenen Eigenschaften vor, wobei noch zu beachten ist, daß unter Umständen anscheinend (neben den eigentlichen cyclischen Chromogenen) auch andere akzessorische Gruppen in den Kondensationsvorgang einbezogen werden können.

Der rein chemischen Betrachtung werden sich beim Studium eines bestimmten Melanins, dem heutigen Stande des Problems entsprechend, zunächst zwei Fragen aufdrängen. Die eine lautet: Welcher cyclische Eiweißkomplex war bei der Entstehung dieses Melanins vorwiegend beteiligt? Das Tyrosin oder das Tryptophan oder etwa beide gleichzeitig? Oder muß überdies die Beteiligung anderer Komplexe angenommen werden?

Daran schließt sich aber die andere Frage: Welches Bild kann man sich von der Umgestaltung des betreffenden Chromogens in ein Melanin machen? Handelt es sich um eine Beladung eines cyclischen Kernes mit zahlreichen Hydroxylen, oder beschränkt sich etwa die Arbeit des oxydativen Fermentes darauf, den cyclischen Kernen einzelne Wasserstoffatome zu entziehen und so die Vorbedingung für den Ablauf von Kondensations- und Polymerisationsvorgängen zu schaffen?[1])

Den bisherigen Erfahrungen entsprechend kann weder von der chemischen Analyse noch von Abbauversuchen eine befriedigende Antwort auf derartige Fragen erwartet werden, und die Forschung sieht sich der Notwendigkeit gegenüber, nach anderen, noch nicht beschrittenen Wegen Umschau zu halten, insbesondere auch die Behelfe der physikalischen Chemie heranzuziehen.

Da drängt sich der Gedanke auf, ob nicht vielleicht die Methode der calorimetrischen Untersuchung, welche ja bekanntlich auf vielen Gebieten der Biochemie so wichtige Er-

[1]) Eine solche Dehystrierung wird z. B. auch für die oxydative Bildung von Anilinschwarz aus Anilin angenommen.

Digitized by Google

folge zu verzeichnen hat, auch dem Studium der Melanine nützlich werden und zur Vertiefung desselben beitragen könnte.

Die prinzipielle Berechtigung eines derartigen Gedankens ergibt sich aus folgender einfacher Überlegung: Der Brennwert des Benzols liegt in der Nähe von 10 000 Einheiten für die Gewichtseinheiten. Der Eintritt eines Hydroxyls drückt bereits den Brennwert tief herab: Phenol 7800 Cal., ein Dioxybenzol (Brenzcatechin, Resorcin, Hydrochinon) weist nur mehr rund 6200 Cal., ein Trioxybenzol (Pyrogallol) nur noch etwa 5000 Cal. auf. Oder andere Beispiele[1]):

Material	Calorien	Material	Calorien
Anthrachinon	7400	Benzoesäure	6300
Dioxyanthrachinon . . .	6000	Oxybenzoesäure	5200
Trioxyanthrachinon . . .	5500	Dioxybenzoesäure	4400
		Trioxybenzoesäure	3700

Falls sich also z. B. Tyrosin unter Einwirkung eines oxydativen Fermentes in ein Melanin umwandelte und dabei, ohne sonstige weitgehende Veränderungen zu erfahren, in seinem cyclischen Anteile mit mehreren Hydroxylen beladen würde, so müßte das resultierende Melanin einen Brennwert aufweisen, der tief unter die Größenordnung des Tyrosinwertes fällt.

Oder umgekehrt: Wenn wir bei Untersuchung eines aus Tyrosin hervorgegangenen Melanins wahrnehmen würden, daß sein Brennwert von der Größenordnung des Tyrosinwertes nicht wesentlich abweicht, so dürften wir daraus, die Intaktheit der Seitenkette vorausgesetzt, die Folgerung ziehen, daß der aromatische Kern sich nicht etwa mit zahlreichen Hydroxylen beladen, daß die Oxydation sich vielmehr auf die Eliminierung von H-Atomen beschränkt habe.

Nun ist es ja allerdings einleuchtend, daß die experimentellen Voraussetzungen für derartige schematische Überlegungen vorderhand in praxi noch nicht gegeben sein werden. Insbesondere muß man sich klarmachen, daß jede Kürzung der aliphatischen Seitenkette bei der Melaninbildung (z. B. ein Übergang von Tyrosin in Oxyphenylacetaldehyd, wie ihn Bach neuerdings vermutet) geeignet sein wird, den Brennwert des Gesamtkomplexes zu steigern. Übertrifft doch z. B. der Brennwert des Phenols (7800 Cal.) denjenigen des Phenylalanins um rund 1000 Einheiten.

Immerhin dürfte sich die calorimetrische Methode als geeignet erweisen, verbunden mit der chemischen Analyse, gewisse Anhaltspunkte zu gewähren und diese zu ergänzen.

Von diesem Gesichtspunkte aus habe ich eine Reihe calorimetrischer Verbrennungen von Melaninpräparaten und melaninartigen Substanzen ausgeführt.

Meine Untersuchungen beziehen sich zunächst auf Hippomelaninpräparate, die mir von Professor v. Fürth[2]) zur Verfügung gestellt wurden.

[1]) Auf Grund von Landolt Börnstein, Physikal.-chemische Tabellen, Berlin 1912.

[2]) Vgl. O. Fürth und E. Jerusalem, Hofmeisters Beiträge **10**, 136. 1907.

Digitized by Google

Dieselben waren in folgender Weise dargestellt worden: Melanotische Lymphdrüsentumoren von Schimmeln wurden in zerkleinertem Zustande einige Stunden lang mit rauchender konzentrierter Salzsäure gekocht, wobei die Pigmentkörner ungelöst blieben, während die anderen Gewebsbestandteile einer vollständigen Desintegration anheimfielen. Nach Verdünnung mit dem mehrfachen Wasservolumen wurde die Pigmentmasse mit Hilfe eines gehärteten Saugfilters von der dunkelgefärbten Flüssigkeit getrennt, ausgewaschen, noch einmal mit kochender, rauchender Salzsäure, sodann mit kochendem Wasser extrahiert, neuerlich abgesaugt, schließlich mit siedendem Alkohol und Äther behandelt.

Das so gewonnene Pigment bildete eine körnige schwarzbraune Masse, die sich als nicht nur in allen indifferenten Lösungsmitteln sowie in rauchender Salzsäure, sondern auch in konzentrierter Natronlauge unlöslich erwies. Von den beiden untersuchten Präparaten erwies sich das eine trotz der eingreifenden Reinigungsprozeduren noch immer als sehr aschereich, das andere Präparat dagegen enthielt keine bestimmbare Aschenmenge.

Ich untersuchte ferner eine aus dem Hippomelanin durch Alkalischmelze gewonnene Melaninsäure. Dieselbe war derart dargestellt worden, daß Hippomelanin in einer Silberschale mit der mehrfachen Menge Ätzkali einige Stunden lang im Ölbade geschmolzen, die Schmelze in Wasser gelöst und die dunkle Lösung mit Säure gefällt worden war.

Ich habe ferner zwei Melaninpräparate untersucht, die (nach einem ähnlichen Vorgange, wie er bei den Hippomelaninen beschrieben wurde) aus zwei mit melanotischen Tumoren durchsetzten Menschenlebern dargestellt worden sind. In beiden Fällen handelte es sich um Lebermetastasen, die einem melanotischen Chorioidealsarkome ihre Entstehung verdankten.

Zum Vergleiche mit diesen natürlichen Melaninen habe ich einige Melanoidine untersucht, d. i. melaninähnliche Substanzen, die (nach dem Vorgang Schmiedebergs) durch Zerkochen von Proteinen mit rauchender Salzsäure gewonnen waren. Der sich dabei abscheidende, dunkelgefärbte Niederschlag wurde nach Verdünnung mit Wasser auf einem gehärteten Filter gesammelt, ausgewaschen, mit Alkohol und Äther gewaschen, getrocknet, gewogen und schließlich der calorimetrischen Bestimmung zugeführt.

Ich teile meine Resultate tabellarisch mit. Die Zahlen für den Brennwert sind, soweit mir ausreichendes Material zu Gebote stand, Mittelzahlen aus mehreren untereinander ausreichend übereinstimmenden Verbrennungen in der Berthelotschen Bombe[1]).

[1]) Bezüglich der in diesem Laboratorium üblichen Technik der Ausführung calorimetrischer Verbrennungen sei auf die Publikation von Otto v. Fürth und H. Kozitschek, diese Zeitschr. **96**, 297, 1919, verwiesen.

Digitized by Google

Tabelle.

Präparat	Herkunft	Stickstoffgehalt in Prozenten	Aschengehalt in Prozenten	Brennwert für 1 g der aschenfreien Trockensubstanz	Ausbeute in Prozenten
Melanin I	Melanotische Lymphdrüsengeschwülste von Pferden	10,8	0	5818	—
Melanin II	dgl.	9,1	17,8	5504	—
Melaninsäure	dgl.	8,25	0	5878	—
Melanin III	Metastatische, melanotische Tumoren aus menschlicher Leber	8,6	0	5632	—
Melanin IV	dgl.	6,5	0	7296	—
Melanoidinsäuren	Durch hydrolytische Eiweißspaltung mit konzentrierter Salzsäure aus:				
	Fibrin	6,1	1,8	7130	6
	Bluteiweiß	—	0	6809	3½
	Eieralbumin I	6,5	2,2	5933	—
	Eieralbumin II	—	1,2	5127	5

Wir wollen uns nunmehr die Frage vorlegen, ob diese Befunde eine Deutung in einem bestimmten Sinne zulassen.

Was zunächst das Hippomelanin betrifft, ist dieses dem normalen Hautpigmente wesensverwandt.

Wissen wir doch, daß das aus den Tegumenten der Pferde, insbesondere der Schimmel, unter Schwund des Haarpigmentes in die Lymphdrüsen wandernde und sich in denselben anhäufende Pigment vielfach den Anstoß zur Bildung gutartiger melanotischer Tumoren liefert. In bezug auf die Melaninbildung in den Tegumenten liegt es nun sicherlich auf Grund der heutigen Erfahrung am nächsten, das Tyrosin oder aber (im Sinne Blochs) das aus dem Tyrosin durch Oxydation hervorgegangene Dioxyphenylalanin dafür verantwortlich zu machen. Meine calorimetrischen Bestimmungen widersprechen dieser Auffassung ebensowenig wie die Analyse des Hippomelanins. (Aus den Analysen von Berdez und Nenski ergibt sich, daß Hippomelanin

Digitized by Google

bzw. Hippomelaninsäure auf je ein Stickstoffatom 6—7 Kohlenstoffatome enthalten.)[1]) Beträgt doch der Brennwert des Tyrosins rund 5900, derselbe ist sonach von derselben Größenordnung wie der Brennwert unserer Hippomelaninpräparate sowie des einen von unseren beiden Lebermelaninen.

Das andere meiner Lebermelanine weist allerdings einen erheblich größeren Brennwert auf (über 7000). Leider war die Ausbeute gerade in diesem Falle zu gering um eine Wiederholung der Verbrennung nach einer Erneuerung der Reinigungsprozedur zu gestatten. Wir können also nicht dafür einstehen, ob nicht etwa (z. B. durch Anhaften eines kolloiden Lipoides) der Brennwert in diesem Falle gefälscht worden sei.

Wenn demnach als Muttersubstanz der Tegumentmelanine in erster Linie an das Tyrosin und seine Derivate gedacht werden muß, gilt keineswegs das gleiche für die bei der Eiweißspaltung durch konzentrierte Mineralsäuren ausflockenden melaninartigen Substanzen, die Melanoidinsäuren.

Wir haben nach allem, was wir von der Entstehung derselben wissen, insbesondere nach den neuen Untersuchungen Gortners und seiner Mitarbeiter, nicht den mindesten Grund, daran zu zweifeln, daß wir es hier mit Derivaten des Tryptophans zu tun haben, und daß sie dieser bei der Säurehydrolyse verschwindenden Eiweißkomponente ihre Entstehung verdanken. In vollem Einklange mit dieser Auffassung stehen, wie mir Professor Fürth mitzuteilen gestattet, die von mir beobachteten Ausbeuten an Melanoidinsäure, verglichen mit dem Tryptophangehalt der betreffenden Eiweißkörper, wie er sich auf Grund von Untersuchungen ergibt, die in diesem Laboratorium zur Zeit im Gange sind.

Material	Ausbeute an Melanoidinsäure in %	Tryptophangehalt in %
Fibrin	6	5
Bluteiweiß	$3^1/_2$	3—4
Keratin aus Hornspänen	1	1
Gelatine S	Spuren	0
Eieralbumin	5	$2—2^1/_2$

[1]) Allerdings wird neuerdings der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl, die meinen Zahlen zugrunde liegt, bei ähnlichen Substanzen Mißtrauen entgegengebracht z. B. von Terres nach Fischer, Abhandlungen über Kohle III (1918).

Digitized by Google

Wenn das Eieralbumin bei der Säurehydrolyse wesentlich mehr Melanoidin liefert, als seinem Tryptophangehalt entsprechen dürfte, so liegt das offenbar daran, daß die Huminsubstanzen, welche dem in diesem Proteine reichlich vorhandenen Glucosamin entstammen, sich dem Kondensationsprodukte beimengen und wegen analoger chemischer und physikalischer Eigenschaften in keiner Weise zu trennen sind. Diese Beimengung kommt auch im Brennwerte des Eieralbuminmelanoidins deutlich zum Ausdruck: Entsprechend dem niederen Brennwerte der Kohlenhydrate (ca. 4000) ist der Brennwert dieses Melanoidins relativ niedrig, während die Melanoidine aus Fibrin und Bluteiweiß mit ihrem Brennwert in die Größenordnung des Tryptophanwertes hineinfallen[1]).

Es wäre nicht ohne Interesse, die natürlichen Melanine mit den melaninartigen Substanzen zu vergleichen, die angeblich aus einfachen cyclischen Substanzen bei elektrolytischer Oxydation entstehen können. So konnte ich beispielsweise (dem Vorgange einer älteren Arbeit von Bartoli und Papasogli folgend) eine melaninartige Substanz aus Phenol in sodaalkalischer Lösung erhalten, mit der zusammen sich ein rötliches Öl abschied. Da die Elektrolyse jedoch zwischen Kohlenelektroden erfolgt, wie Bartoli und Papasogli angeben, wird dabei die Anode angegriffen, und die Produkte der Kohlenzersetzung bilden einen schwarzen Niederschlag, der wegen analoger chemischer und physikalischer Eigenschaften in keiner Weise von den angeblichen Phenolderivaten zu trennen ist. Der Brennwert eines derartigen Phenolmelanins (ca. 7000) lag wesentlich niedriger als der des Phenols (7800). Bei elektrolytischer Oxydation einer alkalischen Tyrosinlösung in einem Leitfähigkeitsgefäß mit platinierten Platinelektroden sieht man von der Anode braune Wolken ausgehen, die sich durch die ganze Lösung verbreiten und eine klare, braungefärbte Lösung darstellen. Leider war die Ausbeute in diesem kleinen Gefäße viel zu gering, um das so entstehende „Melanin" näher untersuchen zu können. Ich habe diese Versuche nicht fortgesetzt.

Leider sehe ich mich zur Zeit infolge äußerer Umstände außerstande, diese Untersuchungen fortzusetzen. Ich glaube aber

[1]) Dieser kann auf Grund der Brennwerte der Komponenten des Tryptophans (Indol und Alanin) auf 7000 bis 8000 Cal. geschätzt werden.

Digitized by Google

immerhin die vorläufigen, wenn auch lückenhaften Ergebnisse mitteilen zu dürfen, in der Hoffnung, daß eine Fortsetzung derselben an der Hand eines größeren Materiales der Klärung des so verwickelten Melaninproblems und der Charakterisierung melaninartiger Substanzen vielleicht in Zukunft zugute kommen könnte.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Durig sowie Herrn Prof. v. Fürth, der nicht nur die Arbeit ermöglichte, sondern dauernd mit Interesse unterstützte, meinen wärmsten Dank auszusprechen.

Wien, 11. Dezember 1919.

Anmerkung bei der Korrektur.

In Verfolg einer Arbeit, die derzeit an der Wiener Technischen Hochschule in Ausführung begriffen ist, konnte ich feststellen, daß Kohlenhydrate (Traubenzucker, Cellulose) bei einem 6 stündigen Kochen mit konz. HCl, wie sie die untersuchten Melanoidine lieferte, ca. 25% einer ähnlichen Substanz ergeben, insofern diese Humussäuren ebenfalls in Wasser und Säuren unlöslich sind, der Brennwert belief sich zu etwa 5000. Als je 0,5 g des Hippomelanins I, der Melanoidinsäure und einiger Huminsäuren in je 100 ccm 25 proz. NH_3 kalt suspendiert, bis zur Hälfte eingedampft und auf 300 ccm mit Wasser verdünnt wurden, konnte ich übereinstimmend die elektrische Kataphorese zur Anode als Charakteristicum eines elektronegativen Kolloids feststellen. Die kolloiden klaren schwarzbraunen Lösungen sind wochenlang beständig. Besonders wichtig ist die elektrolytische Bildung von melaninartigen Körpern aus Dioxyphenylalanin, Phenol usw. und das gleichartige Verhalten aller dieser Körper inklusive Braunkohlenhumin auch gegen Wasserstoffsuperoxyd und die Folgerungen, die sich z. B. aus den Arbeiten E. Fischers über Glucol, dem Vergleich mit Chinonen, Odéns Fulvosäuren und Cumaronen und Cumaronharzen ziehen lassen, wodurch das Problem in den Mittelpunkt der physiologischen so gut als der Lebensmittel-, Kohlen-, Cellulose- und Agrikulturchemie tritt.

Wien, 19. Februar 1920.

Digitized by Google

Chinin und Blut.

I. Mitteilung.

Ein Beitrag zur Pathogenese des Schwarzwasserfiebers.

Von

Stefan Rusznyák.

(Aus der III. med. Klinik der Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 8. Dezember 1919.)

Das Chinin ist einer der längst bekannten und am meisten angewendeten Arzneistoffe, und trotzdem sind unsere Kenntnisse über das Wesen seiner Wirkung noch sehr lückenhaft. Besonders die mannigfachen Beziehungen zwischen Chinin und Blut verdienen eine gründlichere Erforschung, als dies bisher geschah, denn anscheinend spielen gerade diese Beziehungen bei der spezifisch therapeutischen Wirkung und bei dem Schwarzwasserfieber die Hauptrolle. Auf Veranlassung Herrn Prof. Baron v. Korányis untersuchte ich, von den bekannten Versuchen Matkos[1]) ausgehend, die gegenseitige Wirkung von Chinin, Säuren und Laugen aufeinander bei der Hämolyse. Die Untersuchungen können in zwei Gruppen geteilt werden, und zwar: 1. Einwirkung von Säuren und Laugen auf die Chininhämolyse und 2. Wirkung des Chinins auf die verschiedenen Hämolysen.

A. Die Chininhämolyse.

Die verschiedenen Chininsalze haben eine verschieden starke hämolytische Wirkung. Der Grenztiter des salzsauren Chinins, mit welchem ich arbeitete, liegt ungefähr bei einer Verdünnung von 1:200*). Die Gegenwart von Säure oder eines Phosphatgemisches mit einer $H^{\cdot}$-Konzentration von $0{,}96 \times 10^{-6}$ hemmt

*) Um die durch Hintze[2]) entdeckte Photoaktivität des Chinins bei der Hämolyse auszuschalten, wurden die Versuche immer im dunklen Thermostaten bei 37 ° C ausgeführt.

Digitized by Google

die Chininhämolyse, während letztere durch Lauge gesteigert wird. Diese Wirkung ist nicht besonders stark, aber auch in größeren Verdünnungen nachweisbar. So war bei einem Versuch die komplett lösende Konzentration des Chinins 1 : 200 (bezogen auf eine 5 proz. Suspension von Hammelblutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung), durch die Anwesenheit von Milchsäure in einer Verdünnung von 1 : 40 000 wurde sie aber auf ca. 1 : 100 heruntergedrückt, während eine $^n/_{400}$-Natriumcarbonatkonzentration sie auf ca. 1 : 300 erhöhte.

Die Vorbehandlung der Blutkörperchen mit Säure oder mit Lauge wirkte im selben Sinne. Wurden Hammelblutkörperchen einige Zeitlang mit einer mit physiologischer Kochsalzlösung zu 1 : 20 000 verdünnten Milchsäurelösung behandelt, dann zentrifugiert und gewaschen, zeigten sie eine größere Resistenz gegenüber Chinin. Die in ähnlicher Weise mit einer $^n/_{200}$-Na_2CO_3-Lösung vorbehandelten Blutkörperchen erwiesen sich dagegen als minder resistent. Auch die Kohlensäure wirkte hier wie eine Säure; welcher Umstand mit Rücksicht auf die späteren Versuche besonders bemerkenswert ist.

In defibriniertes Menschenblut wurde Kohlensäure eingeleitet, so lange, bis die Flüssigkeit einen dunklen Farbenton angenommen hat, während in einem anderen Gefäß Blut mit Oxygen behandelt wurde. Nach einiger Zeit wurde aus beiden Blutportionen eine je 5 proz. Suspension in 0,9 proz. Kochsalzlösung bereitet und beide Suspensionen der Einwirkung einer Chininlösung unterworfen. Bei einer Chininverdünnung von 1 : 150 erfolgte bei 37° C nach $^3/_4$stündigem Verweilen bei den mit O_2 vorbehandelten Blutkörperchen eine fast komplette Lyse, während bei den mit CO_2 behandelten davon nichts zu merken war.

Die Chininhämolyse hat also eine gewisse Ähnlichkeit mit der Kobragifthämolyse [Bang[3])], indem sie ebenfalls durch Säuren verhindert wird. Die Annahme, daß das Kobrahämotoxin eine schwache Säure ist, läßt sich vielleicht auch auf die Chininwirkung anwenden.

B. Die Säure- und die Laugenhämolyse.

Säuren haben eine starke hämolytische Wirkung, so löst Milchsäure noch in einer Verdünnung von 1 : 5000 und Ameisensäure bei 1 : 10 000 Hammelblutkörperchen auf. Bei Gegenwart

Digitized by Google

von Serum bedarf es zur kompletten Lösung einer bedeutend höheren Konzentration (1 : 1000). Durch Chinin wird die Säurehämolyse gehemmt, so daß es bei Gegenwart einer Chininkonzentration von 1 : 600, einer Milchsäurekonzentration von 1 : 1000 (anstatt 1 : 5000) und von Ameisensäure einer Verdünnung von 1 : 2000 (statt 1 : 10 000) zur kompletten Lösung bedarf.

Gerade entgegengesetzt ist die Wirkung des Chinins auf die Laugenhämolyse. Die hämolytische Kraft des Natriumcarbonates wird durch die Gegenwart einer Chininverdünnung von 1 : 2500 fast verdoppelt.

Eine geradezu paradoxe Erscheinung trat bei der Vorbehandlung der Blutkörperchen mit Chinin auf. Nach den obigen Erfahrungen bei der Hämolyse war bei mit Chinin vorbehandelten roten Blutkörperchen eine erhöhte Resistenz gegenüber Säuren und eine verminderte gegenüber Laugen zu erwarten. Wie aus nachstehendem Protokollauszug zu ersehen ist, trat gerade das Gegenteil ein.

Es wurde eine 5 proz. Hammelblutemulsion $^3/_4{}^h$ lang bei 37 ° C in einer Chininlösung von 1 : 1000 digeriert, dann wurde sie zentrifugiert, sodann mit einer physiologischen Kochsalzlösung gewaschen und hiervon abermals eine 5 proz. Aufschwemmung bereitet. Der hämolytische Titer einer Milchsäure- und einer Natriumcarbonatlösung wurde nun an je einer Reihe normaler und an einer mit Chinin vorbehandelter Blutkörperchenemulsion ausgewertet. Der Erfolg war, daß normale Blutkörperchen von einer Milchsäureverdünnung von 1 : 8000 nur inkomplett, chininisierte dagegen komplett gelöst wurden und letztere sogar noch bei 1 : 20 000 eine Spur von Lösung zeigten. Die Na_2CO_3-Lösung verursachte in einer Konzentration von $^n/_{40}$ eine komplette Lösung der normalen Blutkörperchen, während die mit Chinin vorbehandelten durch diese Konzentration nicht angegriffen wurden.

Es ergibt sich also die interessante Erscheinung, daß während das Chinin die Säurehämolyse hemmt und die Laugenhämolyse fördert, die mit Chinin vorbehandelten Blutkörperchen gerade gegenüber von Säure eine verminderte und gegenüber von Lauge eine erhöhte Resistenz erlangen. Eine Erklärung für dieses paradoxe Verhalten konnte bis jetzt noch nicht gefunden werden.

Digitized by Google

C. Die Kohlensäurehämolyse.

Unter den Säurehämolysen gebührt der durch Kohlensäure hervorgerufenen eine Sonderstellung. Eine Aufschwemmung von roten Blutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung wird durch das Durchleiten von gasförmiger Kohlensäure in kürzester Zeit hämolysiert. Wie alle Säurehämolysen, wird auch diese durch die Gegenwart von Salzen oder von Serum gehemmt [Lagrange[4])]. Nach den oben mitgeteilten Versuchen war zu erwarten, daß auch das Chinin eine hemmende Wirkung zeigen wird; es traf jedoch das Gegenteil ein.

Eine 5 proz. Aufschwemmung von Hammelblutkörperchen in einer hypertonischen (1,5 proz.) Kochsalzlösung konnte z. B. auch durch ein 5—10 Minuten dauerndes Durchleiten von CO_2 nicht hämolysiert werden, dagegen war nach Zusatz von Chinin in einer Konzentration von 1 : 500 schon in kürzester Zeit eine starke Hämolyse nachweisbar. In einem Kontrollversuch konnte ich mich überzeugen, daß das Chinin in der obigen Konzentration ohne CO_2 keine hämolytische Kraft besitzt.

Ähnlich waren die Verhältnisse bei Versuchen mit defibriniertem Blut. In defibriniertes Blut kann bekanntlich stundenlang CO_2 eingeleitet werden, ohne daß der geringste Austritt von Hämoglobin bemerkbar wäre; bei Gegenwart von für sich unwirksamen Chininmengen (z. B. 1 : 500 — 1 : 1000) jedoch zeigt die Kohlensäure schon nach einigen Minuten eine ausgesprochene hämolytische Wirkung und bewirkt nach einiger Zeit eine fast völlige Hämolyse. Von den drei untersuchten Blutarten erwies sich Rinderblut am empfindlichsten, etwas weniger das Menschenblut, und am längsten brauchten die Hammelblutkörperchen, um aufgelöst zu werden.

Die schützende Wirkung des Serums oder einer hypertonischen Salzlösung wird also schon durch geringe Chininmengen aufgehoben. Eine Erklärung dieses interessanten Befundes kann derzeit noch nicht mit Sicherheit gegeben werden, es spricht jedoch manches dafür, daß der Angriffspunkt der Chininwirkung in den roten Blutkörperchen zu suchen ist, welche dadurch gewissermaßen gegenüber von Kohlensäure sensibilisiert werden*).

*) Auch die Behandlung mit gallensauren Salzen hat eine ähnliche Wirkung [Patschke-Jandas[5])].

Digitized by Google

D. Sonstige Hämolysen.

Von den zahlreichen übrigen Hämolysearten wurden untersucht: die Hämolyse durch destilliertes Wasser, durch Saponin, durch Seife und durch ein Immunhämolysin. Die Versuchsergebnisse sind zusammengefaßt kurz die folgenden:

Die Wasser- und die Saponinhämolyse werden durch Gegenwart von Chinin verstärkt. Die Lyse durch Natriumoleat wird (auch in Gegenwart von Serum) anfangs verlangsamt, im Endergebnis jedoch bedeutend gesteigert. Die Komplementlyse wird gehemmt.

Zusammenfassung.

In zahlreichen Versuchen konnte gezeigt werden, daß sich verschiedene hämolytisch wirksame Stoffe einerseits und das Chinin andererseits gegenseitig beeinflussen. Dieser Einfluß besteht je nach den verwendeten Stoffen und je nach der Versuchsanordnung bald in einer Förderung, bald in einer Hemmung. Eine pathologische Wichtigkeit gebührt am ehesten vielleicht der bedeutenden Förderung der CO_2Hämolyse durch das Chinin. Diese Wirkung des Chinins könnte bei der Entstehung des Schwarzwasserfiebers eine Rolle spielen. Es wäre denkbar, daß bei einer lokalen Zirkulationsstörung in den inneren Organen bei Gegenwart einer genügenden Chininkonzentration durch die vermehrte Kohlensäure eine Hämolyse ausgelöst wird. Es liegt mir fern, zu behaupten, daß auf diese Weise das ganze Problem der Entstehung des Schwarzwasserfiebers restlos geklärt wäre. Es bleibt noch manches unklar; so in erster Reihe der Zusammenhang des Schwarzwasserfiebers mit der Malaria, dann auch die Ursache der angenommenen Zirkulationsstörung. Versuche an Menschen, nach einer Chinineinnahme durch künstliche Stauung in den Extremitäten eine Hämolyse hervorzurufen, fielen auch bei Malariakranken negativ aus. Im anscheinend komplizierten Mechanismus des Schwarzwasserfiebers könnte also der beschriebenen Chininwirkung nur ein Teil zugeschrieben werden. Vielleicht ist sogar dieser Mechanismus nicht in jedem Falle der gleiche.

Die Versuchsergebnisse sind zusammengefaßt die folgenden:

Die Chininhämolyse wird durch Säuren gehemmt (auch durch Kohlensäure) und durch Laugen gefördert.

Die Säurehämolyse wird durch Chinin gehemmt, die Laugenhämolyse gefördert. Mit Chinin vorbehandelte Blutkörperchen

Digitized by Google

sind im Gegensatz hierzu gegen Säure empfindlicher und gegen Lauge resistenter.

Die Kohlensäurehämolyse wird durch Chinin gefördert resp. die Schutzwirkung des Serums und der Salze aufgehoben.

Wasser- und Saponinhämolyse werden durch Chinin gefördert, Komplementhämolyse anfangs gehemmt, später gefördert.

Literatur.

[1]) Matko, Wien. klin. Wochenschr. 1918, Nr. 3, 5, 23. — [2]) Hintze, Dtsch. med. Wochenschr. 1916, Nr. 39. — [3]) Bang, Chemie und Biochemie der Lipoide. Wiesbaden 1911, S. 122. — [4]) Lagrange, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 23, Heft 1. — [5]) Patschke und Jandas, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 28, Heft 3—5.

Digitized by Google

Untersuchungen über die titrimetrische Phosphorsäurebestimmung nach Neumann.

Von

Poul Iversen.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 13. Januar 1920.)

Neumann teilte 1903 seine bekannte Methode zur Bestimmung von Phosphor in organischen Substraten mit[1]). Nach einer Destruktion mit Schwefelsäure und Salpetersäure fällt er, in einer Lösung eines bestimmten Sauerheitsgrades und einer angemessenen Konzentration von Ammoniumnitrat, die Phosphate mit Ammoniummolybdat als Phosphorammoniummolybdat. Der Bodensatz wird zu wiederholten Malen mit eiskaltem Wasser dekantiert und das Waschwasser durch ein Filter gegossen, das kleine mitgerissene Mengen des Bodensatzes zurückhält. Nach dem Waschen wird das Filter in den Kolben hinübergebracht, der die Hauptmenge des Bodensatzes enthält, und es wird aus einer Bürette so viel $^n/_2$-NaOH zugesetzt, daß der Bodensatz gelöst wird, und außerdem wird auch ein Überschuß zugesetzt. Das zugesetzte Natriumhydroxyd setzt sich mit dem Bodensatz nach der folgenden Gleichung um:

$$2\,(NH_4)_3PO_4 \cdot 24\,MoO_3 \cdot 4\,HNO_3 + 56\,NaOH = 24\,Na_2MoO_4 + 4\,NaNO_3 + 2\,Na_2HPO_4 + 32\,H_2O + 6\,NH_3\,.$$

Das befreite Ammoniak wird durch Kochen entfernt, und es wird mit $^n/_2$-H_2SO_4 und mit Phenolphtalein als Indikator zurücktitriert. Die Phosphormenge, ausgedrückt in Milligramm, erhält man danach durch Multiplikation der verbrauchten Anzahl Kubikzentimenter $^n/_2$-NaOH mit 0,5539, welcher Faktor sich theoretisch aus obiger Gleichung berechnen läßt.

---

[1]) A. Neumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**, 115, 1903.

Digitized by Google

I. P. Gregersen[1]) hat später durch eine systematische Variation der verschiedenen Reagenzien die Bedingungen festgestellt, unter denen ein Bodensatz der obengenannten Zusammensetzung gefällt wird, d. h. die Fällungsbedingungen, unter denen er bei Anwendung des theoretischen Faktors 0,5539 richtige Analysenresultate erhält. Gregersen hat ferner darauf aufmerksam gemacht, daß es notwendig ist, mit 0,5—1 ccm Säure überzutitrieren und danach die Kohlensäure wegzukochen. Er hat ein großes Analysenmaterial mitgeteilt, aus dem erhellt, daß man in einer Lösung eines Phosphorsalzes Mengen von 1—30 mg Phosphor mit einer Genauigkeit von 0,06 mg bestimmen kann.

Seitdem hat Heubner mitgeteilt[2]), daß man, um richtige Resultate zu erhalten, mit einem größeren Faktor als mit dem theoretischen zu rechnen hat. Er bestimmte den erwähnten Faktor mittels 4 größerer Reihen von Analysen und fand als mittlere Zahlen der verschiedenen Reihen die Werte 0,574, 0,576, 0,567 und 0,565. Er empfiehlt danach, bei der Berechnung den Faktor 0,57 zu benutzen. Heubner führte die Analyse nicht in der von Neumann-Gregersen angegebenen Form aus, sondern modifiziert sie, indem er den gelben Bodensatz von Phosphorammoniummolybdat auf dem Filter mit $^n/_4$-NaOH löst und dasselbe sodann mit Wasser spült. Dadurch gewinnt er den Vorteil, während des Titrierens kein Filter im Kolben zu haben, führt aber die schwierige Aufgabe in die Analyse ein, ein Filter mit Natron reinzuspülen, ein Verhältnis, das vielleicht die recht großen Schwankungen innerhalb derselben Analysenreihe seines Materials bedingt.

Neumanns Methode mit der Modifikation von Gregersen ist eine längere Reihe von Jahren hindurch mit vorzüglichen Resultaten im hiesigen Institut angewandt worden. Für Untersucher, die nicht mit der Methode vertraut waren, war es aber gelegentlich mit einiger Schwierigkeit verbunden, es zu so genauen Resultaten zu bringen, wie wir es nach Gregersens Untersuchungen verlangen zu dürfen meinen. Ich fühlte mich teils aus diesem Grunde, teils auch durch Heubners abweichende Resultate dazu veranlaßt, eine neue Untersuchung über die Ge-

[1]) I. P. Gregersen, Zeitschr. f. physiol. Chem. **53**, 455. 1907.
[2]) W. Heubner, Diese Zeitschr. **64**, 393. 1914.

Digitized by Google

nauigkeit der Methode anzustellen, und zwar namentlich in betreff der Wirkung, welche schwankende Säure- und Basemengen imstande sind, auf die Resultate auszuüben.

Die folgenden Analysenreihen sind sämtlich mit einer Lösung angestellt worden, die 0,5744% KH_2PO_4 enthielt. 100 ccm dieser Lösung sollen der Berechnung gemäß einen Glühungsrest von 0,2492 g KPO_3 ergeben; gefunden wurde 0,2488 g.

Nach Gregersen soll man, nachdem das Ammoniak weggekocht ist, neutralisieren und 0,5—1 ccm $^n/_2$-H_2SO_4 zusetzen, worauf die Kohlensäure weggekocht und mit $^n/_2$-NaOH zurücktitriert wird. Ich untersuchte erst, welchen Einfluß ein größerer Säureüberschuß als der angegebene auf das Resultat ausübt. In der in Tab. I angeführten Versuchsreihe wurde ein Überschuß von etwa 4 ccm $^n/_2$-H_2SO_4 zugesetzt, die Analysen im übrigen aber wie gewöhnlich ausgeführt.

Tabelle I.

Nr.	P in mg		Fehler	Berechneter Faktor
	berechnet	gefunden		
1	3,27	3,10	÷0,17	0,584
2	3,27	3,02	÷0,25	0,600
3	3,27	3,02	÷0,25	0,600
4	13,08	12,79	÷0,29	0,566
5	13,08	12,76	÷0,32	0,568
6	13,08	12,87	÷0,21	0,563
Mittel				0,580

Die Tabelle zeigt, daß man bei Übertitrieren mit größeren Mengen $^n/_2$-H_2SO_4, als von Gregersen angegeben, bei Anwendung des theoretischen Faktors 0,5539 zu niedrige Werte erhält. „Der berechnete Faktor" (der Faktor, mit dem man die verbrauchte Anzahl Kubikzentimeter $^n/_2$-NaOH multiplizieren muß, um richtige Resultate zu erhalten) wird hiernach also höher als der theoretische. Es wurde bei diesen Analysen wie gewöhnlich mit Natron bis zur Rotfärbung titriert, es zeigte sich aber, daß die Flüssigkeit — im Gegensatz zu dem, was sonst geschieht — sich nach kurzem Stehenlassen entfärbt, um sich nach Zusatz von noch 1—2 Tropfen NaOH wieder zu färben, und diese Erscheinung wiederholte sich mehrmals, bevor ein bleibender Umschlag eintrat. Die für diesen Punkt berechneten Werte entsprachen ungefähr den richtigen.

Digitized by Google

Sodann untersuchte ich die Bedeutung eines schwankenden Überschusses von NaOH bei der Lösung des gelben Bodensatzes und dem darauffolgenden Wegkochen des Ammoniaks. Neumann gibt einen Überschuß von 5—6 ccm $^n/_2$-NaOH an. Im hiesigen Institut benutzen wir seit vielen Jahren einen Überschuß von etwa 4 ccm für ein Flüssigkeitsvolumen von etwa 200 ccm. In der in Tab. II angeführten Analysenreihe wurde aber ein Überschuß von etwa 8 ccm $^n/_2$-NaOH angewandt, während die Analyse im übrigen wie gewöhnlich ausgeführt wurde.

Tabelle II.

Nr.	P in mg		Fehler	Berechneter Faktor
	berechnet	gefunden		
1	6,54	6,65	+0,11	0,545
2	6,54	6,74	+0,20	0,537
3	13,08	13,29	+0,21	0,545
4	13,08	13,20	+0,12	0,548
5	19,62	20,01	+0,39	0,542
6	19,62	20,01	+0,29	0,546
Mittel				0,544

Man sieht, daß die Anwendung eines zu großen Überschusses von NaOH beim Wegkochen des Ammoniaks zu hohe Resultate ergibt — und in Übereinstimmung damit einen zu kleinen berechneten Faktor. Bei diesen Analysen fand beim Stehenlassen keine Entfärbung statt.

Die Ursache zu den in den obenstehenden Versuchsreihen erhaltenen irrtümlichen Resultaten ist, daß das im Kolben vorhandene Filter recht bedeutende Mengen Säure und Natron in einer solchen Weise binden kann, daß die aufgenommenen Mengen schwer zu titrieren sind. Namentlich gilt dies vom Natron. So wird, nachdem das Filter mit einem größeren Überschuß von Natron gekocht worden ist, sogar ein darauffolgendes Kochen mit einem geringen Überschuß von Säure die ganze vom Papier gebundene Natronmenge nicht ganz entfernen. Man kann sich leicht von der Richtigkeit des Angeführten überzeugen, wenn man Blindanalysen ausführt, bei denen man ein Filter im Kolben anbringt und einen bedeutenden Überschuß von Säure von Natron anwendet und im übrigen wie gewöhnlich verfährt. Die Fehler werden vollständig vermieden, wenn man bei der Lösung des gelben Bodensatzes nur die gerade notwendige Natronmenge

Digitized by Google

verwendet, indem man unter kräftigem Schütteln nur kleine Natronmengen auf einmal zusetzt und darauf höchstens einen Überschuß von 4 ccm $^n/_2$-NaOH zusetzt, und wenn man, nachdem das Ammoniak weggekocht worden ist, höchstens 0,5—1 ccm H_2SO_4 zusetzt.

Tab. III stellt eine Analysenreihe dar, die genau nach Gregersens Angabe und mit einem Überschuß von höchstens 4 ccm $^n/_2$-NaOH ausgeführt wurde. In sämtlichen Analysen wurde in 250 ccm Flüssigkeit gefällt.

Tabelle III.

Nr.	ccm $^n/_2$-NaOH	P in mg		Fehler	Berechneter Faktor
		berechnet	gefunden		
1	2,41	1,31	1,34	+0,03	0,5436
2	2,41	1,31	1,34	+0,03	0,5436
3	2,38	1,31	1,32	+0,01	0,5504
4	2,38	1,31	1,32	+0,01	0,5504
5	2,29	1,31	1,29	−0,02	0,5721
6	6,02	3,27	3,33	+0,06	0,5432
7	5,97	3,27	3,31	+0,04	0,5477
8	5,93	3,27	3,29	+0,02	0,5514
9	5,88	3,27	3,26	−0,01	0,5561
10	5,81	3,27	3,22	−0,05	0,5628
11	11,91	6,54	6,59	+0,05	0,5491
12	11,91	6,54	6,59	+0,05	0,5491
13	11,93	6,54	6,61	+0,07	0,5482
14	11,86	6,54	6,56	+0,02	0,5514
15	11,76	6,54	6,51	−0,03	0,5562
16	23,56	13,08	13,05	−0,03	0,5552
17	23,61	13,08	13,08	±0,00	0,5540
18	23,63	13,08	13,09	+0,01	0,5535
19	23,61	13,08	13,08	±0,00	0,5540
20	23,51	13,08	13,02	−0,06	0,5560
21	35,48	19,62	19,65	+0,03	0,5530
22	35,42	19,62	19,61	−0,01	0,5539
23	35,51	19,62	19,66	+0,04	0,5525
24	35,55	19,62	19,69	+0,07	0,5519
25	35,38	19,62	19,60	−0,02	0,5546
Mittel					0,5526

In Tab. III wurde die gefundene Phosphormenge mittels des theoretischen Faktors 0,5539 berechnet. Man sieht, daß die Abweichung zwischen der berechneten und der gefundenen Menge dieselbe Größe hat bei Anwendung großer wie bei Anwendung kleiner Phosphormengen und höchstens 0,07 mg beträgt. Ferner, daß die gefundenen Werte bald größer, bald kleiner sind als die berechneten und sich ungefähr gleichmäßig zu beiden Seiten der-

Digitized by Google

selben verteilen. Diese Verhältnisse zeigen, daß die Abweichungen von zufälligen Fehlern herrühren und daß kein methodischer Fehler vorliegt. Wenn der theoretische Faktor, wie hier benutzt, unrichtige Werte ergäbe, müßte die Abweichung zwischen den berechneten und gefundenen Werten zunehmen, wenn die Phosphormenge in der Analyse zunimmt; die Tabelle zeigt aber, wie erwähnt, daß dies nicht der Fall ist.

Der berechnete Faktor, der in der letzten Kolumne der Tabellen abgeführt ist, ergibt als Mittel sämtlicher 25 Analysen 0,5526, welcher Wert nur unbedeutend vom theoretischen 0,5539 abweicht.

Die obenstehenden Analysenreihen zeigen deutlich, daß es notwendig ist, die erwähnten Anweisungen sehr genau zu befolgen; da aber Heubner, wie bereits gesagt, nicht mit dem Filter im Kolben titriert, können sie nicht dartun, weshalb er auf Grund seiner Analysen mit dem Faktor 0,57 rechnen muß. Dieser Faktor wird noch schwerer verständlich dadurch, daß ein nicht hinlängliches Waschen des Filters, so daß etwas NaOH darauf zurückbleibt, den Faktor kleiner machen wird.

Ein Vergleich zwischen Heubners Analysen einerseits und Gregersens Analysen und den meinigen andererseits zeigt, daß für die beiden Materialgruppen ein sehr bedeutender Unterschied zwischen der gegenseitigen Übereinstimmung von Analysen mit ungefähr demselben Phosphorgehalt besteht. Tab. IV enthält die größten Schwankungen des berechneten Faktors, die sich in zwei von meinen Analysenreihen und in den beiden von Heubners Analysenreihen finden, die in betreff der Phosphormengen den meinigen am nächsten liegen.

Tabelle IV.

	Lösung	ccm $n/_2$-NaOH zur Analyse	Berechneter Faktor		Differenz
			höchster	niedrigster	
Heubner	D	ca. 11	0,575	0,554	**0,021**
	C	ca. 20	0,580	0,555	**0,025**
Iversen		ca. 12	0,5562	0,5482	**0,008**
		ca. 23	0,5560	0,5535	**0,0028**

Heubners niedrigster Faktor liegt hier etwas niedriger als meine höchsten, und man sieht, daß die Differenz zwischen seinem höchsten und niedrigsten berechneten Faktor weit größer

Digitized by Google

ist als derjenige, den ich zwischen den meinigen finde. Daraus ergibt sich, daß er mit einer Genauigkeit arbeitet, die bedeutend geringer ist als die Genauigkeit, die die Methode bei dem von uns benutzten Verfahren zu liefern imstande ist.

Nachtrag. Nach Abschluß des Manuskriptes obiger Abhandlung ist mir eine gerade erschienene Arbeit von Kleinmann[1]) zuhanden gekommen, die mehrere der von mir behandelten Fragen berührt. Kleinmann hat, nach einem im wesentlichen der Methode Gregersens entsprechenden Verfahren, mit einer Phosphormenge von 4,36 mg eine Reihe von 7 Analysen (S. 98) ausgeführt und findet dabei den Faktor 0,575, der also größer ist als der theoretische, aber mit dem Heubnerschen übereinstimmt. Wäscht er aber den Niederschlag nach Taylor und Miller mit 50% Alkohol, so findet er den theoretischen Faktor.

Worauf die mangelnde Übereinstimmung zwischen Kleinmanns, meinen und Gregersens Resultaten beruht, wird nur aus einem in allen Einzelheiten erschöpfenden Vergleich zwischen den verfolgten Verfahren hervorgehen können. Kleinmann betrachtet es nach seinen Untersuchungen als bewiesen, daß die Abweichung des empirischen Faktors vom theoretischen auf die Löslichkeit des Phosphorammoniummolybdats im Wasser zurückzuführen ist. Daß eine nachweisbare Lösung des Niederschlages in dem eiskalten Waschwasser indessen in meinen Versuchen nicht stattgefunden hat, geht mit Sicherheit aus obiger Tab. III hervor. Da zum Dekantieren und Waschen sozusagen die gleiche Menge Waschwasser benutzt wird bei großem wie bei kleinem Niederschlag, müßte der berechnete Faktor nämlich bei kleinen Phosphormengen größer sein als bei großen Phosphormengen, was aber der Tabelle nach nicht der Fall ist. Kleinmann berührt Seite 102 die von mir oben behandelte Frage von den Störungen, welche die Wirkung kochender Laugen und Säuren auf dem Filter auf die Resultate ausüben können. Zu seiner Äußerung, daß bei Anwendung von $^n/_2$-Lösungen der Fehler kaum bemerkbar war, habe ich zu bemerken, daß dies nur zutrifft, wenn man bei einem Volumen von 150—200 ccm den oben erwähnten Überschuß anwendet.

[1]) H. Kleinmann, diese Zeitschr. **99**, 95. 1919.

Digitized by Google

Zur Bestimmung des Phosphorgehalts kleinerer Mengen von Blut und Plasma.

Von

Poul Iversen.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 13. Januar 1920.)

Die Studien der letzten Jahre über die verschiedenen phosphorhaltigen Bestandteile des Blutes haben an die analytische Chemie große Ansprüche gestellt. Zuvörderst kommt es auf die Erzielung einer verhältnismäßig großen Genauigkeit bei Bestimmungen des Phosphorgehalts kleiner Blut- oder Serummengen an, welcher Anspruch stets gestellt werden wird, wo es sich um die Einführung von Serienbestimmungen handelt, oder wo das Verfahren in der Klinik Anwendung finden soll.

Die bisher angewandten Phosphorbestimmungsmethoden sind teils colorimetrische und nephelometrische Messungen, teils Titration ad modum Neumann. Da Feigl neuerdings eine erschöpfende Übersicht über diese Methoden geliefert hat[1]), werde ich, bevor ich zu meinen eigenen Untersuchungen übergehe, nur anführen, daß die wichtigsten colorimetrischen Methoden von Taylor und Miller[2]) und von Marriot und Howland[3]) ausgearbeitet worden sind, welche Verff. angeben, von 0,01—0,1 mg Phosphor bestimmen zu können. Die nephelometrische Messung wurde von Greenwald in die Biochemie eingeführt[4]); er destruiert das Blut oder Serum nach Neumann und fällt die Phosphate mit dem von Pouget und Chouchack angegebenen Reagens als Strychninphosphormolybdat[5]), das einen fein suspendierten Niederschlag darstellt, der in einem Colorimeter mit einem frischen Niederschlag mit bekanntem Phosphorgehalt verglichen wird. Er kann bis 0,013 mg Phosphor bestimmen und wendet zu seinen Analysen etwa 1 ccm Serum an. Die Methode scheint gute Resultate zu

[1]) Feigl, diese Zeitschr. **92**, 1. 1918.

[2]) Taylor und Miller, Journ. of Biolog. Chem. **18**, 215. 1914.

[3]) Marriot und Howland, ebenda **32**, 241. 1917.

[4]) Greenwald, ebenda **21**, 29. 1915.

[5]) Pouget und Chouchack, Bull. de la Soc. chim. **5** u. **9**. 1909 u. 1911.

Digitized by Google

ergeben und ist von Feigl in einer großen Reihe von Untersuchungen benutzt und empfohlen worden.

Bloor hat darauf aufmerksam gemacht, daß man die Phosphate als Silberverbindungen fällen und diese Niederschläge nephelometrisch bestimmen kann[1]), ist jedoch in einer späteren Arbeit[2]) zur Strychninfällung übergegangen.

Da meine Methode an Neumanns Titrationsprinzip anknüpft, werde ich dies etwas näher besprechen.

Neumanns Verfahren[3]) beruht darauf, daß man in einer Lösung von Phosphaten eines bestimmten Sauerheitsgrades und eine bestimmte Menge Ammoniumnitrat enthaltend, durch Zusatz von Ammoniummolybdat die Phosphate quantitativ als Phosphorammoniummolybdat konstanter Zusammensetzung fällen kann, wenn das Fällen bei etwa 80° stattfindet.

Das in der Weise gefällte Phosphorammoniummolybdat hat die Formel $(NH_4)_3PO_4 \cdot 12\,MoO_3 \cdot 2\,HNO_3$ und wird sich mit NaOH nach der Gleichung

$$2\,(NH_4)_3PO_4 \cdot 24\,MoO_3 \cdot 4\,HNO_3 + 56\,NaOH = 24\,Na_2MoO_4 + 4\,NaNO_3 + 2\,Na_2HPO_4 + 32\,H_2O + 6\,NH_3$$

umsetzen. Man sieht, daß eine PO_4-Gruppe 28 Molekülen NaOH entspricht, ein Verhältnis, daß natürlich eine sehr große Rolle spielt, wo es gilt, die Methode zu Mikrobestimmungen anzuwenden.

Man wäscht den Niederschlag rein von Säure, setzt Natron in Überschuß zu, kocht das Ammoniak weg, bestimmt durch Titration mit Säure, wieviel NaOH verbraucht worden ist, und kann hieraus die in der Analyse vorhandene Phosphormenge berechnen. Als Indikator ist Phenolphtalein zu benutzen.

Neumann schlug die Anwendung von $^n/_2$-NaOH vor, und man findet dann, nach der Gleichung berechnet, die Phosphormenge in Milligramm ausgedrückt durch Multiplikation der verbrauchten Anzahl Kubikzentimeter $^n/_2$-NaOH mit dem Faktor 0,5539. Neumann selbst gab an, daß die Methode zuverlässig sei, wo es sich um die Bestimmung von Mengen von 15—50 mg P_2O_5 handelte, aber I. P. Gregersen, der die Fällungsbedingungen in betreff der Menge der verschiedenen Reagenzien rationell variierte und die wertvolle Übertitration mit Säure mit darauffolgendem Wegkochen der Kohlensäure einführte, fand[4]), daß die Methode viel weiter zu spannen vermochte. Aus dem großen Analysenmaterial geht hervor, daß er imstande war, von 1—30 mg Phosphor mit einem absoluten Fehler von 0,06 mg zu bestimmen.

Greenwald modifizierte die Methode etwas[5]), indem er durch Goochtiegel filtrierte und wusch. Den Niederschlag löste er in $^n/_7$-NaOH, aber

[1]) Bloor, Journ. of Biolog. Chem. **22**, 133. 1915.
[2]) Bloor, ebenda **36**, 33. 1918.
[3]) Neumann, Zeitschr. f. physiol. Chemie **37**, 115. 1902—03.
[4]) I. P. Gregersen, ebenda **53**, 453. 1907.
[5]) Greenwald, Journ. of Biolog. Chem. **14**, 369. 1913.

Digitized by Google

er setzte erst nach Ivar Bangs Weisung Formol zu und ersparte in der Weise das Wegkochen des Ammoniaks. Er kann nach seiner Methode 1 mg Phosphor mit einer Genauigkeit von etwa 2% bestimmen.

Zu einer ähnlichen Genauigkeit bringen Taylor und Miller es mit denselben Mengen[1]). Sie waschen den Niederschlag mit 60 proz. Alkohol, worin er unlöslich ist, und zentrifugieren zu wiederholten Malen ab. Die Methode ist der Beschreibung nach recht beschwerlich, da der Niederschlag sich leicht an den Seiten des Zentrifugenglases ansetzt. Sowohl Greenwald als Taylor und Miller geben an, daß mehrere Stunden verlaufen, bevor der Niederschlag ein quantitativer ist.

Schließlich ist das Neumannsche Prinzip vor ganz kurzem von L. Dienes angewandt worden[2]); es fällt den Phosphor nach Treadwells Angabe[3]) als Phosphorammoniummolybdat. Das Fällen geschieht in wenig Kubikzentimetern, der Niederschlag wird durch kräftiges Zentrifugieren erst einmal mit Wasser und dann dreimal mit einer 1 proz. KNO_3-Lösung gewaschen. Die Titration geschieht mit $^n/_{10}$-NaOH. Durch Analyse von 0,05 und 0,08 mg Phosphor findet er empirisch einen Faktor, der dem von Treadwell bei Bestimmung von Phosphor in Stahl angegebenen entspricht, d. h. einem Kubikzentimeter $^n/_{10}$-NaOH entspricht 0,133 mg Phosphor. Dieser Faktor liegt indes etwa 20% höher als der von Neumann angegebene (0,1108 bei Titration mit $^n/_{10}$-NaOH), und meiner früheren Arbeit[4]) gemäß kann ich ihn durchaus nicht als richtig anerkennen. Treadwell erhält diesen Faktor, indem er die Formel des Phosphorammoniummolybdats zu $(NH_4)_3PO_4 \cdot 12\,MoO_3$ ansetzt, also ohne 2 Moleküle HNO_3. Dienes schreibt: „Bei kleineren P-Mengen sinkt der 1 ccm Lauge entsprechende P bedeutend, welcher Umstand bei der Berechnung unbedingt berücksichtigt werden muß." Er gibt mit anderen Worten an, daß der Faktor kleiner wird, wenn man mit kleineren Phosphormengen arbeitet; er teilt aber nichts darüber mit, mit welchen Werten man in dem Falle zu rechnen hat.

Neumann fällte in 250 ccm Flüssigkeit, und Gregersen wendet in der Regel dasselbe Volumen an, macht aber darauf aufmerksam, daß man bei der Bestimmung von kleinen Mengen (bis 1 mg Phosphor) in 50 ccm 15 proz. Ammoniumnitrat zu fällen hat, wozu 5 ccm konz. H_2SO_4 gesetzt worden sind. Um sehr kleine Phosphormengen nach Neumann bestimmen zu können, versuchte ich in nur 10 ccm zu fällen und benutzte in diesem Volumen Fällungsreagenzien derselben Konzentrationen, wie Gregersen beim Fällen in 250 ccm Flüssigkeit anwandte. Es zeigte sich, daß man besonders darauf Gewicht legen muß, daß

[1]) Taylor und Miller, Journ. of Biolog. Chem. **18**, 215. 1914.
[2]) L. Dienes, diese Zeitschr. **95**, 1. 1919.
[3]) Treadwell, Lehrb. d. analyt. Chemie II. 5. Aufl. S. 490. 1911.
[4]) Poul Iversen, diese Zeitschr. **104**, 15. 1920.

Digitized by Google

die Säuremenge nicht zu groß wird, indem man in dem Falle nicht alles fällen kann. So muß sich bei den von mir bestimmten Phosphormengen höchstens 0,5 ccm konz. H_2SO_4 in 10 ccm finden, und bei Phosphormengen unter 0,04 mg geschieht das Fällen am leichtesten, wenn man nur 0,3 ccm H_2SO_4 anwendet. Die Konzentration des Ammoniumnitrats beträgt wie gewöhnlich 15%, und ich benutze 1 ccm 10 proz. Ammoniummolybdat.

Die Analyse verläuft wie folgt: Phosphatlösung, Ammoniumnitrat und Säure, die zusammen etwa 9 ccm ausmachen sollen, werden gerade bis zum Kochen erwärmt, und es wird 1 ccm 10 proz. Ammoniummolybdat zugesetzt. Der Inhalt des Kolbens färbt sich sofort gelb, falls Phosphor vorhanden ist, die Fällung tritt aber nicht gleich ein. Es ist notwendig, stark zu schütteln, bis der Niederschlag sich zu zeigen beginnt, was dadurch leicht zu erkennen ist, daß der Inhalt des Kolbens unklar wird. Wenn der Niederschlag sich zu zeigen beginnt, sucht man mittels einer kleinen Flamme die Temperatur im Kolben auf 70—80° zu halten und schüttelt fortwährend, bis der gelbe Niederschlag sich in einer durchaus klaren und farblosen Flüssigkeit befindet. Solange die Flüssigkeit noch gelb ist, ist die Fällung keine vollständige; das Schütteln braucht doch selten länger als ein paar Minuten zu dauern. Nach einer Abkühlung kann das Waschen des Niederschlages beginnen.

Auf diesem Stadium der Analyse verwendeten Neumann und Gregersen ein dichtes Filter, das später nebst dem gewaschenen Niederschlag im Kolben angebracht wurde, in dem die Titration stattfand. Die durch das Filter im Kolben bereiteten Nachteile habe ich in meiner oben erwähnten Abhandlung dargetan, und wenn man mit $^n/_{25}$-NaOH titriert, wird das Vorhandensein eines Filters die Resultate ganz zunichte machen. Heubner[1]) löste den gelben Niederschlag auf dem Filter mit $^n/_2$-NaOH und spülte das Filter darauf von NaOH rein; der Niederschlag ist aber nur leichtlöslich in $^n/_{25}$-NaOH, wenn es erwärmt wird, oder wenn ein sehr großer Überschuß angewandt wird. Greenwald und Taylor und Miller vermieden diese Schwierigkeit, indem sie bzw. durch einen Goochtiegel filtrierten und in Zentrifugengläsern wuschen. Soll man aber viele Analysen ausführen, ist es unbequem, mit dem Goochtiegel zu arbeiten, und

[1]) Heubner, diese Zeitschr. **64**, 393. 1914.

Digitized by Google

die Reinigung beim Abzentrifugieren ist wie früher erwähnt sehr beschwerlich.

Ich überwand die Schwierigkeiten, indem ich erhärtete Filter (Schleicher und Schüll, 9 cm R. F. P. 575) benutzte; der Niederschlag kann dann nach dem Waschen durch den Strahl einer Spritzflasche vollkommen vom Filter abgespült werden. Das Waschen kann mit etwa 40 ccm kaltem Wasser geschehen. Der Niederschlag wird in den Kolben zurückgespült, in dem gefällt wurde, und es wird $^n/_{25}$-NaOH zugesetzt, bis zu einem Überschuß von 1—2 ccm und außerdem 3—4 kleine Bimssteinstücke. Im Kolben müssen nun am liebsten mindestens 50 ccm Flüssigkeit vorhanden sein, und das Ammoniak wird nun weggekocht, indem man über einem Drahtnetz bis zu etwa 20 ccm eindampft. Man setzt 1 Tropfen 1 proz. alkoholische Lösung von Phenolphtalein und so viel $^n/_{25}$-H_2SO_4 zu, daß ein Umschlag eintritt, und weiter etwa 0,4 ccm. Zwecks Wegkochen der Kohlensäure wird ein paar Minuten gekocht und nach einem Abkühlen mit $^n/_{25}$-NaOH bis zu rotem Umschlag zurücktitriert.

Bei Neumanns Titration soll die verbrauchte Anzahl Kubikzentimeter $^n/_2$-NaOH mit dem theoretischen Faktor 0,5539 multipliziert werden, um die Phosphormenge in Milligramm zu

Nr.	ccm $^n/_{25}$-NaOH	mg in P		Fehler in mg	Berechneter Faktor
		berechnet	gefunden		
1	0,34	0,015	0,015	0,000	0,0442
2	0,37	0,015	0,016	+0,001	0,0406
3	0,39	0,015	0,017	+0,002	0,0384
4	0,29	0,015	0,013	−0,002	0,0517
5	0,29	0,015	0,013	−0,002	0,0517
6	0,40	0,015	0,018	+0,003	0,0375
7	0,64	0,030	0,028	−0,002	0,0469
8	0,75	0,030	0,033	+0,003	0,0400
9	0,67	0,030	0,030	0,000	0,0448
10	0,64	0,030	0,028	−0,002	0,0469
11	0,65	0,030	0,029	−0,001	0,0462
12	0,72	0,030	0,032	+0,002	0,0417
13	0,64	0,030	0,028	−0,002	0,0469
14	1,31	0,061	0,058	−0,003	0,0465
15	1,38	0,061	0,061	0,000	0,0442
16	1,30	0,061	0,058	−0,003	0,0469
17	2,76	0,121	0,122	+0,001	0,0439
18	2,80	0,121	0,124	+0,003	0,0432
19	2,78	0,121	0,123	+0,002	0,0435
20	2,71	0,121	0,120	−0,001	0,0446
Mittel					**0,0445**

Digitized by Google

ergeben. Benutzt man, wie hier $^n/_{25}$-NaOH, so ist der theoretische Faktor 0,0443. Dieser Faktor wurde bei den folgenden Analysen benutzt.

Ich habe nach der angegebenen Methode die in der Tabelle angeführte Reihe von Analysen kleiner Phosphormengen ausgeführt, indem ich von einer Lösung von KH_2PO_4 ausging, deren Phosphorgehalt nach Glühen gewichtsanalytisch bestimmt wurde. Bei der Titration benutzte ich Mikrobüretten.

Wie die Tabelle zeigt, kann man von 0,015 bis 0,121 mg P mit einem absoluten Fehler von $\pm$ 0,003 mg bestimmen, ein Verhältnis, das, wie bei den Makroanalysen, darauf deutet, daß der gelbe Niederschlag die gleiche Zusammensetzung hat, wenn die Phosphormenge auch bedeutend schwankt. Die Resultate wurden, wie erwähnt, mit dem theoretischen Faktor 0,0443 berechnet. In der Tabelle ist für jede Analyse der empirische Faktor berechnet, der selbstverständlich bei den kleinsten Mengen nicht wenig schwankt, bei etwas größeren Mengen gut mit dem theoretischen übereinstimmt; das Mittel der berechneten Faktoren beträgt 0,0445, was dem theoretischen Wert sehr nahe kommt.

Auch bei größeren Phosphormengen, als in der Tabelle angeführt, gibt die Methode dieselbe Genauigkeit ab. Bei Phosphormengen, die wesentlich größer sind als 0,2 mg, ist die Analyse doch etwas weniger bequem ausführbar, indem das Waschen des Niederschlages hier mit etwas größerer Schwierigkeit verbunden ist und mehr Zeit in Anspruch nimmt.

Bei Phosphorbestimmungen in Plasma und Blut wird bei der Analyse im großen ganzen wie oben beschrieben verfahren. Ich habe nur noch vollständigkeitshalber einiges beim Verfahren zu besprechen.

Bei Bestimmungen der Phosphormenge in Blut und Plasma benutze ich bzw. 0,3 und 0,5 ccm, und bei der Bestimmung des säurelöslichen Phosphors (nach Greenwald die Phosphormenge der Stoffe, die in Lösung treten, wenn Blut oder Plasma mit einer salzsauren Pikrinsäurelösung gefällt und extrahiert wird) benutze ich 0,5 ccm Blut und 1,0 ccm Plasma. Es ist angenehm, mit den angegebenen Mengen zu arbeiten, doch kann man ohne Schwierigkeiten an der halben Menge analysieren. Zum Fällen und Extrahieren habe ich eine Lösung benutzt, die 0,25% HCl und 0,5% Pikrinsäure enthielt.

Digitized by Google

Bei den Gesamtbestimmungen wird das Blut oder das Plasma in einem 100 ccm Kjeldahlkolben mit kurzem Hals oder in einem 100 ccm Kochkolben angebracht, und es wird 0,7 ccm konz. H_2SO_4 und 1 ccm HNO_3 zugesetzt, worauf entweder in schräger Stellung auf Drahtnetz oder besser auf Arganbrenner erwärmt wird, indem man mit kleiner Flamme beginnt. Ist die Salpetersäure weggekocht, wird wieder 1 ccm zugesetzt, und man fährt damit fort, bis die Destruktion eine vollkommene ist, meist nach Anwendung von 3 ccm HNO_3. Wenn man bei den genannten Blut- oder Serummengen 0,7 ccm konz. Schwefelsäure anwendet, wird die Flüssigkeit nach der Destruktion eine für die folgende Molybdatfällung angemessene Menge Säure enthalten.

Soll die Phosphorbestimmung im Filtrat aus einer Pikrinsäurefällung ausgeführt werden, wird gleichfalls 0,7 ccm konz. H_2SO_4 zugesetzt, und es wird eingedampft, bis das Verkohlen eingesetzt hat (braunschwarze Farbe); man setzt darauf 1 ccm HNO_3 zu und verfährt wie oben, bis die Flüssigkeit vollkommen farblos ist. Die Pikrinsäure muß ganz entfernt werden; eine geringe zurückgebliebene Spur davon wird sich dadurch zu erkennen geben, daß der Kolbeninhalt bei Verdünnung mit destilliertem Wasser gelb wird; in dem Falle muß wieder eingedampft und noch 1 ccm HNO_3 zugesetzt werden.

Nach der Destruktion wird mit 10 ccm dest. Wasser verdünnt und bei kräftigem Schütteln des Kolbens ein paar Minuten lang gekocht. Dies Kochen ist, wie bereits von Neumann dargetan, absolut notwendig. Nach dem Kochen, wobei etwa 4 ccm Wasser verdampfen, werden 3 ccm 50proz. Ammoniumnitrat und nach wiederholtem Kochen 1 ccm 10proz. Ammoniummolybdat zugesetzt, worauf die Analyse wie oben beschrieben vonstatten geht.

Nachtrag. Nach Abschluß des Manuskriptes obiger Abhandlung ist mir eine vor wenig Wochen erschienene Arbeit von Kleinmann zuhanden gekommen. Kleinmann teilt darin[1]) einige Untersuchungen mit, in denen er nach Neumanns Methode kleine Phosphormengen zu bestimmen gesucht hat, indem er wie Heubner den Niederschlag aus dem Filter mit Natronlauge ($^n/_{20}$) herauslöst. Bei 0,436 g P findet er den theoretischen Faktor, bei 0,218 g P dagegen einen etwa 20% über demselben gelegenen Faktor. Er erklärt diese Abweichung durch einen Ver-

[1]) H. Kleinmann, diese Zeitschr. **99**, 104. 1919.

Digitized by Google

weis darauf, daß der gelbe Niederschlag bei den befolgten Fällungsverfahren bei Vorhandensein von sehr kleinen Phosphormengen das Ammoniumnitrat mitreißt. Bei einer Menge von 0,218 mg P soll indessen nach Kleinmann (S. 92) nur eine 5% des theoretischen Ammoniumgehaltes des gelben Niederschlags entsprechende Ammoniakmenge mitgerissen werden, und da Neumanns Titration so durchaus überwiegend eine Titration des Molybdänkomplexes ist, wird eine Abweichung von 5% des Ammoniakgehaltes des Niederschlages unmerkbar sein. Sogar eine Vermehrung des Ammoniakgehaltes des Niederschlages um 100% wird den bei der Titration gefundenen Wert nur um 10% steigern können. Bei dem von mir befolgten Fällungsverfahren fand ich, wie die Tabelle zeigt, daß sogar bei sehr kleinen Phosphormengen (0,015—0,3 mg) die bei Benutzung des theoretischen Faktors gefundenen Werte den angewandten Mengen entsprachen.

Digitized by Google

Studien über die Reifung der Cerealien.[1])

Von

Heinrich Lüers.

(Mitteilung aus der deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie in München.)

(Eingegangen am 13. Januar 1920.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Unsere Kenntnisse über die Vorgänge während des Reifungsprozesses der Cerealien sind noch keine allzu umfangreichen. Die bisherigen Beobachtungen auf diesem Gebiete liegen entweder ziemlich weit zurück oder sie erstrecken sich auf zeitlich sehr weit auseinander liegende Stadien der Reife, z. B. auf die Periode des Entwicklungsstadiums einerseits und der Vollreife andererseits, oder endlich sie fußen zum Teil auf unzulänglichen, mangelhaften Methoden. Einige Arbeiten der neueren Zeit, unter denen vor allem diejenigen von H. Schjerning und F. Schulze und dessen Mitarbeitern genannt seien, machen hierin eine Ausnahme; wir werden im weiteren Verlauf dieser Abhandlung noch eingehender darauf zurückkommen. Aber trotzdem uns die Ergebnisse dieser Arbeiten einen großen Schritt in der Erkenntnis des Reifeprozesses nach vorwärts machen ließen, bleibt noch viel Arbeit zu leisten, bis wir zu einem klaren und einheitlichen Verständnis aller biochemischen und physiologischen Prozesse, die sich im reifenden Samenkorn abspielen, gelangt sein werden.

Wir machten es uns deshalb zur Aufgabe, zur Förderung des Verständnisses der erwähnten Prozesse durch die unten folgenden Versuche beizutragen. Da jedoch eine zu große Folge rasch hintereinander drängender Analysen die Arbeitskraft eines einzelnen zu sehr in Anspruch nehmen würde, wodurch die Ge-

[1]) Habilitationsschrift.

Digitized by Google

nauigkeit und Sicherheit der Untersuchungen Schaden leiden müßte, beschränkten wir uns einerseits nur auf einen kleinen Teil in der Gesamtheit der sich abspielenden Prozesse und andererseits auch nur auf ein engbegrenztes Gebiet in der langen Folge der Reifeerscheinungen. Demgemäß erstrecken sich die folgenden Untersuchungen nur auf die analytische Verfolgung der Veränderungen im Säure- und Amidstickstoffgehalt, und zwar während der letzten Stadien des Reifungsprozesses, von der späteren Gelbreife zur Vollreife und während der Lagerung des Kornes. Das Studium der Veränderungen dieser beiden Stoffgruppen wählten wir hauptsächlich deshalb, weil wir schon seit längerer Zeit diesbezügliche analytische Arbeitsmethoden auf ähnlichen und anderen Gebieten mit Erfolg angewandt und uns über deren Wert und Brauchbarkeit ein klares Bild gemacht hatten. Der Beschreibung und Erörterung unserer Versuche sei deshalb eine nähere Beschreibung dieser beiden Methoden selbst vorangestellt.

Arbeitsmethoden.

1. Methode der Säurebestimmung.

In einer früheren Arbeit[1]) haben wir uns bereits eingehend mit der Frage nach der Entstehung und Bestimmung der Säure in Gerste und Malz und ihren Extrakten beschäftigt. Hier sei in Kürze das für den Zusammenhang und das Verständnis des Späteren Wichtige mitgeteilt. Die Bildung der Säure bei der Digestion von Gerste mit Wasser erfolgt durch die Tätigkeit von Enzymen. Die Temperatur ihrer besten Wirksamkeit liegt nach beiden Seiten hin ziemlich scharf begrenzt bei 53° C. Bei dieser Temperatur wird durch dreistündige Digestion bei Gegenwart von Toluol ein dem Maximum der Säurebildung nahekommender Wert erreicht. Die Konzentration, d. h. das Mengenverhältnis von Substrat und Wasser, spielt keine erkennbare Rolle, desgleichen ist auch der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration kein stark ausgeprägter; von einer [H] größer als 10^{-5} und kleiner als $10^{-6,4}$ ab tritt langsam zunehmend Schädigung der säurebildenden Enzyme ein. Bezüglich der Frage nach der Natur der gebildeten Säure konnten mehrere Beweise erbracht werden, daß es sich hauptsächlich um die Entstehung anorgani-

[1]) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **29**, 281. 1915.

Digitized by Google

scher Phosphate aus organischen handelt. Die Bildung der Säure auf enzymatischem Wege ließ sich dadurch beweisen, daß nach Abtötung des Materials mit Alkohol viel kleinere und vor allem von Zeit und Temperatur unabhängige Werte erhalten wurden, ferner dadurch, daß abgetötetes Material mit Malzmehl oder Malzextrakt behandelt, eine bedeutende Zunahme an Säure ergab.

Die Resultate unserer Arbeit und die Beweise für die Phosphatnatur der gebildeten Säure rechtfertigen auch die von uns angewandte Methode der Säurebestimmung. Wir benützten nämlich als Indicator bei der Säuretitrierung ausschließlich Phenolphthalein, da wir unter Anwendung dieses Indicators alle Phosphate durch Überführung ins sekundäre Salz bestimmen. Die praktische Ausführung einer exakten Titration ist jedoch mit mancherlei Schwierigkeiten verbunden. Einmal ist es nicht gleichgültig, bis zu welchem roten Ton des Phenolphthaleins man titriert. Phenolphthalein hat einen Umschlagsbereich von etwa $p_{H^\cdot} = 8{,}3 - 10$, der zwar bei der Titration reiner starker Säuren mit reinen starken Basen mit einigen wenigen Tropfen $^n/_{10}$-Alkali durchlaufen wird, jedoch bei Anwesenheit von Phosphaten infolge ihrer reaktionsregulatorischen Wirkung sich je nach der Menge der Phosphate über viele Kubikzentimeter hin erstreckt. Außerdem zeigen die meisten pflanzlichen Extrakte eine grüngelbe bis rotbraune Färbung, welche die Erkennung eines genau definierten Umschlagspunktes sehr erschwert oder gar unmöglich macht. Zudem findet sehr oft bei der Titration unter dem Einfluß der zunehmenden Hydroxyl-Ionenkonzentration eine Verstärkung der Farbentiefe und mitunter sogar eine Veränderung in der Farbenart, besonders bei gerbstoffhaltigen Extrakten statt, die ihren Teil zur Erschwerung der Titration noch beitragen. Handelt es sich wie in unserem Fall um Auffindung auch der kleinsten Unterschiede und um die genaueste Reproduzierbarkeit der Titrationswerte, so müssen wir unbedingt eine Arbeitsweise voraussetzen, die von all den erwähnten Mängeln frei ist. Sie zu finden, ist uns nun durch folgende Anordnungen gelungen:

Vor allem setzten wir ein für allemal den roten Farbton des Phenolphthaleins fest, auf den wir unsere sämtlichen Analysen titrierten. Auf Grund der oben gemachten Angaben über die Natur der in Betracht kommenden Säure, wählten wir den roten

Digitized by Google

Farbton, welcher sich beim Versetzen einer Lösung von sekundärem Phosphat mit Phenolphthalein ergibt. Wir bereiteten uns nach Angabe S. P. L. Soerensens[1]) unter peinlichstem Ausschluß der Kohlensäure eine $^1/_{15}$-molare Lösung von sekundärem Natriumphosphat (zu Enzymstudine von C. A. F. Kahlbaum, Berlin). Zu 20 ccm dieser Lösung fügte man 2 ccm einer Phenolphthaleinlösung, welche 0,5 g Phenolphthalein im Liter 50 proz. Alkohol enthält. Der rote Farbton, welcher auf solche Weise zustande kommt, entspricht einer Wasserstoffionenkonzentration von $10^{-9,18}$. Alle Phosphatlösungen, welche auf diesen roten Farbton titriert sind, weisen ihren gesamten Gehalt an Phosphorsäure in Form des sekundären Salzes auf. Da die Dissoziation des sekundären Phosphates eine sehr geringe ist, so spielt auch eine Änderung der Phosphatkonzentration keine ausschlaggebende Rolle auf das Resultat der Titration. Die alkalische Phosphatphenolphthaleinlösung ist jedoch wie bekannt, nur von begrenzter Haltbarkeit und verblaßt selbst unter Luftabschluß zusehends. Um uns auch von dieser Unannehmlichkeit zu befreien, stellten wir einige Versuche an, den roten Farbton des Phenolphthaleins durch lichtechte haltbare Teerfarbstoffe nachzuahmen, was uns tatsächlich in völlig befriedigender Weise gelang. War auf diese Weise die erste Forderung, nämlich die nach einem ein für allemal festgesetzten Farbton des Indicators erfüllt, so blieb uns nur noch die Erledigung der zweiten, die Ausschaltung der Eigenfarbe und ihrer Veränderlichkeit während der Titration übrig. Die Anwendung des Walpoleschen Prinzipes, welches an Hand der Abb. 1 erläutert werden soll, verhalf uns zu einem vollen Erfolg auch in dieser Richtung.

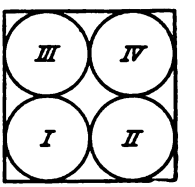


Abb. 1.

In einem viereckigen Kästchen aus Blech[2]) befinden sich vier zylindrische gleichgroße Gläser, durch welche man in Richtung des Pfeiles hindurchsieht. Glas Nr. IV enthält obenerwähnte rote Vergleichslösung, die dem Farbton entspricht, den das sekundäre Phosphat mit Phenolphthalein ergibt. Glas Nr. III enthält

[1]) Asher-Spiro, Ergebnisse der Physiol. 1912.

[2]) Die gesamte Apparatur samt allem Zubehör ist unter dem Namen Titriercoloriskop nach Lüers bei der Firma F. Hellige & Co., Freiburg im Breisgau, zu beziehen.

Digitized by Google

destilliertes Wasser. Glas Nr. I und II je 20 ccm der zu titrierenden Flüssigkeit. Beim Durchblicken gewahrt man rechts eine Mischfarbe aus dem Gelb der zu analysierenden Flüssigkeit und der roten Vergleichslösung. Links erscheint nur die gelbe Farbe der Flüssigkeit allein. Zur Ausführung der Titration verfährt man derart, daß man links 10% des zu titrierenden Flüssigkeitsvolumens an 0,05 proz. alkoholischer Phenolphthaleinlösung und rechts ebensoviel destilliertes Wasser zugibt. Links titriert man dann mit $^n/_{10}$-Lauge bis etwa auf Farbengleichheit mit rechts und setzt dann rechts die gleiche oder besser um ein paar Zehntel Kubikzentimeter vermehrte Menge der links verbrauchten Lauge zu. Dadurch wird einerseits die links erfolgte Verdünnung hergestellt und andererseits die Farbveränderung und Vertiefung, die links während der Titration stattgefunden hat, auch rechts hervorgerufen. Nachdem auf solche Weise beiderseits völlig gleiche Verhältnisse herrschen, wird links zu Ende titriert und gegebenenfalls ein kleiner Überschuß mit $^n/_{10}$-Säure weggenommen. Je nach der Eigenfarbe der zu titrierenden Flüssigkeit ist oft ein einziger Tropfen $^n/_{10}$-Lauge ausreichend, um die Farbengleichheit bzw. -verschiedenheit zwischen rechts und links sicher erkennen zu lassen. Nicht unerwähnt soll bleiben, daß unter Umständen ein kleiner Fehler sich einstellen kann, in dem Falle nämlich, daß bei der Titration im Verhältnis zum Volumen der Analysenlösung sehr viel $^n/_{10}$-Lauge verbraucht wurde. Man wiederholt dann den Versuch mit stärkerer Lauge nochmals, oder man behebt den durch die starke Verdünnung des Indicators verursachten Fehler, indem man vor dem Fertigtitrieren nochmals etwa 10% der verbrauchten Anzahl Kubikzentimeter Lauge an Indicatorlösung zusetzt.

Diese Methode der Säurebestimmung hat sich bei der Titration von Pflanzenextrakten, gefärbten Flüssigkeiten und auch in der Harnanalyse bestens bewährt. Vergleichbestimmungen, von zwei Beobachtern ausgeführt, ergaben meist eine Übereinstimmung bis auf 0,05, oft sogar auf 0,025 ccm $^n/_{10}$-Lauge, einige Übung in der Handhabung der Methode natürlich vorausgesetzt.

Außer dieser Art der Säurebestimmung mit Phenolphthalein als Endanzeiger verfuhren wir noch nach einer anderen Weise, indem wir unsere Extrakte gegen einen zweiten Indicator titrierten.

Digitized by Google

In jüngster Zeit hat A. Reichard[1]) durch Anwendung einer „Stadientitration" gezeigt, daß man möglicherweise zu wertvollen Einblicken in die obwaltenden Säureverhältnisse gelangen kann, wenn man zwei Indicatoren mit verschiedenem Umschlagsbereich verwendet. Reichard benützte ebenso wie wir einerseits Phenolphthalein mit Umschlag bei $p_H = 9{,}18$ und andererseits noch neutrales Azolithminpapier, wie es von C. A. F. Kahlbaum in sehr guter Beschaffenheit hergestellt wird. Dieses Papier zeigt einen Umschlag bei $p_H = 6{,}8$ etwa an. Mit Hilfe dieses Papiers als Indicator lassen sich im großen ganzen alle stärkeren Säuren und die Hälfte des primären Phosphates titrieren, während von da ab dann die schwächeren Säuren, die Aminosäuren, und die zweite Hälfte der Phosphate mit Phenolphthalein als Indicator bestimmt werden können. So gute Dienste auch das Azolithminpapier leistet, so haften ihm doch einige Mängel an. Der Hauptnachteil besteht darin, daß sich eine Titration mit Hilfe dieses Papiers nur durch Tüpfeln bewerkstelligen läßt, Tüpfelreaktionen aber sind, wie bekannt, immer ungenau. Kontrollversuche ergaben auch immer bedeutendere Unterschiede, da eben die Wahrnehmung der neutralen Reaktion gegen dieses Papier viel schwerer zu erkennen ist, als es bei der erwähnten colorimetrischen Methode der Fall ist, und dem persönlichen Empfinden mehr als sonst überlassen bleibt. Selbst wenn man zum Vergleich mit einer Lösung von gleichen Teilen primären und sekundären Phosphats nach Soerensen tüpfelt lassen sich diese Schwierigkeiten nicht völlig beheben. Auch ist das Papier sehr empfindlich gegen äußere Einflüsse. Alle diese Umstände mögen Reichard am Schlusse seiner Arbeit veranlaßt haben, den Wunsch nach einer Methode zu äußern, die es gestattet, ähnlich wie unsere Methode mit Phenolphthalein auch gegen einen anderen Indicator mit einem dem Azolithmin nahestehenden Umschlagspunkt die Titration auszuführen. Da für unsere Untersuchungen mit Rücksicht auf die Feststellung auch sehr kleiner Unterschiede diese Frage besonders wichtig war, versuchten wir auch in dieser Richtung eine geeignete Arbeitsmethode zu finden. Als Indicatoren mit dem erwähnten Umschlagsbereich kommen hauptsächlich zwei in Betracht, die Rosolsäure und das Neutralrot. Die Rosolsäure hat den Nachteil, daß sie einen Umschlag von

[1]) Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen **61**, 57. 1918.

Digitized by Google

der gelben nach der stark roten Seite im alkalischen Gebiet zeigt, so daß eine spätere gleichzeitige Verwendung von Phenolphthalein unmöglich wird. Das Neutralrot[1]) dagegen mit seinem Umschlag von der stark roten nach der hellgelben Farbe im alkalischen Bereich, gestattet sehr gut die spätere Verwendung von Phenolphthalein. Es blieb jetzt nur noch die Festsetzung eines genau definierten Umschlagspunktes übrig. Bei einer Wasserstoffionenkonzentration von $10^{-6,8}$ zeigt Neutralrot ein starkes Rot, das jedoch sehr rasch mit sinkender Wasserstoffionenkonzentration abnimmt, um bei einer $[H^{\cdot}] = 10^{-7,07}$, der Reaktion der neutralen Lösungen, noch einen deutlich rotgelben Mischton aufzuweisen. Da ein Umschlagspunkt bei $p_{H^{\cdot}} = 6,8$ ohnedies eine ziemlich willkürliche Festlegung bedeuten würde, entschieden wir uns für die wahre neutrale Reaktion ($p_{H^{\cdot}} = 7,07$). Wir bereiteten uns wieder eine Standardvergleichslösung, indem wir 6,5 Teile sekundäres Phosphat und 3,5 Teile primäres Phosphat nach Soerensen mischten und zu 20 ccm der Mischung 2 ccm einer Neutralrotlösung zusetzten, welche 0,2 g Neutralrot extra von Kahlbaum im Liter 50 proz. Alkohols enthielt. Mit Rücksicht auf die Veränderlichkeit dieser Lösung, versuchten wir auch diesmal den Farbton des Neutralrotes durch lichtechte, haltbare Teerfarbstoffe nachzuahmen, was auch ohne Schwierigkeiten gelang. Als eine Schwäche des Neutralrots mag seine Empfindlichkeit gegen Neutralsalze angeführt werden. Da die in Betracht kommenden pflanzlichen Extrakte alle einen ziemlich konstanten und hohen Gehalt an Salzen aufweisen, mag der Salzfehler ohne störenden Einfluß sein.

An Hand eines Beispieles sei nun der Gang einer Titration gegen diese beiden Indicatoren erläutert: In die beiden Gläser I und II werden je 20 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit pipettiert. Links gibt man 2 ccm Neutralrotlösung, rechts 2 ccm dest. Wasser zu. Jetzt wird links vorsichtig mit $^{n}/_{10}$-Alkali titriert, bis sich der anfänglich stark rote Farbton einigermaßen dem Mischton rechts aus Standardneutralrotlösung und dem gelben Farbton der vorgeschalteten Analysenflüssigkeit genähert hat. Dann gibt man auch rechts die gleiche Menge der links verbrauchten Kubikzentimeter Lauge, vermehrt um einen geringfügigen Überschuß hinzu, um die Verdünnung und Farbentiefeänderung mitzumachen und titriert links auf völlige Farbengleichheit. Hierauf fügt man links 10% des Flüssig-

[1]) W. Wöllmer (Chem.-Ztg. 1919) verwendete, ohne nähere Angaben zu machen, zu dem gleichen Zwecke das Neutralrot.

Digitized by Google

keitsvolumens an Phenolphtaleinlösung und rechts 2 ccm Neutralrotlösung zu. An Stelle der Neutralrotvergleichslösung wird jetzt die Phenolphtaleinstandardlösung in den Apparat eingesetzt und rechts durch Zugabe von $^n/_{10}$-Alkali, dessen Menge abgelesen wird, der rote Farbton des Neutralrots eben in Gelb übergeführt. Dann titriert man links nahe auf Farbengleichheit, setzt rechts die fehlende Menge Alkali, vermehrt um einen kleinen Betrag, hinzu und titriert links zu Ende.

Zum Beispiel:

links		rechts
20 ccm Analysenlösung		20 ccm Analysenlösung
+ 2 ccm Neutralrotlösung		+ 2 ccm dest. Wasser
+ 0,90 ccm $^n/_{10}$-NaOH		+ 1,10 ccm $^n/_{10}$-NaOH
+ 0,10 ccm $^n/_{10}$-NaOH		
Summe 1,00 ccm $^n/_{10}$-NaOH	Neutralrotneutralität	1,10 ccm $^n/_{10}$-NaOH
+ 2,1 ccm Phenolphthaleinlösung		+ 2 ccm Neutralrotlösung
+ 2,25 ccm $^n/_{10}$-NaOH		+ 2 ccm $^n/_{10}$-NaOH
+ 0,11 ccm $^n/_{10}$-NaOH		+ 0,35 ccm $^n/_{10}$-NaOH
Summe 2,36 ccm $^n/_{10}$-NaOH	Phenolphthaleinneutralität	2,35 ccm $^n/_{10}$-NaOH

Gesamtverbrauch:

3,36 ccm $^n/_{10}$-NaOH 3,45 ccm $^n/_{10}$-NaOH.

Daraus errechnet sich der prozentuelle Gehalt der Gesamtsäure an Neutralrotsäure nach

$$3{,}36 : 1{,}00 = 100 : x$$
$$= 29{,}8\%\ \text{Neutralrotsäure.}$$

So umständlich nach dieser Beschreibung die Arbeitsweise erscheinen mag, so einfach gestaltet sie sich, wenn man sie erst einige Male ausgeführt hat. Eine wesentliche Erleichterung gewährt die Verwendung zweier Büretten, eine für rechts, eine für links, dadurch werden auch bei Ausführung zahlreicher Analysen immerhin mögliche Irrtümer vermieden, besonders wenn man beide Büretten vor jeder Titration auf den gleichen Ausgangspunkt einstellt.

Selbst opalescierende oder durch feine Suspensionen leicht getrübte Lösungen lassen sich auf diese Weise titrieren und ergeben jedenfalls befriedigendere Resultate, als dies ohne Anwendung des colorimetrischen Prinzips möglich wäre. Bei ausgesprochen trüben, undurchsichtigen Lösungen versagt natürlich die Methode.

Einige Titrationsversuche, welche wir mit verschiedenen reinen Lösungen, die im Zusammenhang mit den späteren Untersuchungen einiges theoretisches Interesse hatten, anstellten, sind in Tabelle I zusammengestellt. Vergleichshalber ist auch der Umschlag auf Azolithminpapier mit angeführt.

Digitized by Google

Tabelle I.

Substanz	ccm $^{n}/_{10}$-NaOH			$100 \cdot \frac{\text{Neutralrot}}{\text{Phenolphth.}}$
	Azolithmin $p_H = 6{,}8$	Neutralrot $p_H = 7{,}07$	Phenolphthalein $p_H = 9{,}18$	
10 ccm $^{mol.}/_{15}$ prim. Phosphat	2,55	3,72	6,27	59,3
20 ccm $^{n}/_{10}$-Glykokoll	neutral	0,05	5,00	1,0
20 „ $^{n}/_{10}$-Alanin	„	0,05	4,13	1,2
20 „ $^{n}/_{10}$-Leucin	„	0,05	7,08	0,7
20 „ $^{n}/_{10}$-Ammonchlorid	„	$>0{,}05$	0,75	6,7
20 „ $^{n}/_{10}$-Asparaginsäure	9,65–9,80	9,86	12,03	82,0
20 ccm 1% Lösung von Pepton Witte	alkalisch	schwach alkalisch	1,17	0,0

2. Methode der Amidstickstoffbestimmung nach einem verbesserten Verfahren der Formoltitration[1]).

Schon seit geraumer Zeit benützen wir die Methode der Formoltitration, wie sie Soerensen in seiner grundlegenden Arbeit[2]) 1907 angab, zu den verschiedensten Studien auf dem Gebiete der enzymatischen Veränderungen von Eiweißkörpern und ihrer Abbauprodukte und konnten uns nur immer wieder von der Vortrefflichkeit und Nützlichkeit dieser Methode überzeugen. Da wir es aber immer mit der Feststellung sehr feiner Unterschiede zu tun hatten, wobei sich ähnliche erschwerende Begleiterscheinungen, wie bei der unter 1) erwähnten Säurebestimmung geltend machten, versuchten wir auch hier diese Methode für unsere besonderen Zwecke auf den Boden der größtmöglichen Genauigkeit zu stellen und bildeten uns im Laufe der Zeit ein Verfahren heraus, das sich bereits vielfach bewährte und im Interesse aller, die auf ähnlichem Gebiete arbeiten und mit denselben Schwierigkeiten zu tun haben, auch hier[3]) ausführlich mitgeteilt sei. Vor allem verwendeten wir zur Ausführung der Titration wieder den oben beschriebenen kleinen Apparat, der es unter Verwendung des Walpoleschen Prinzips aufs beste gestattet, sich von der Eigenfarbe der Analysenlösung frei zu machen. Als Vergleichslösung diente uns die gleiche Phenolphthaleinstandardlösung, wie wir sie bereits bei der Methode der

[1]) Vgl. auch L. Grünhut, Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **37**, 304. 1919.

[2]) Diese Zeitschr. **7**, 45. 1907.

[3]) Vgl. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen **38**, 241. 1915.

Digitized by Google

Säurebestimmung benützten. Nach Soerensens Angaben muß die Titration bis zu einem starken Rot, das jedoch mit Rücksicht auf die Erkennung eines Umschlags eine deutlich wahrnehmbare Vertiefung noch zu gestatten hat, erfolgen, damit die Reaktion zwischen der Aminogruppe und dem Formaldehyd und der Titrierlauge eine quantitative sei. Dieser Anforderung genügt in praktisch durchaus befriedigender Weise unsere Phenolphthaleinstandardlösung mit einem Umschlagspunkt von $p_H = 9{,}18$, wie später angeführte Beweise zeigen werden.

Was nun den Ausgangspunkt der Titration anbelangt, so verfuhren wir anfangs immer nach Angabe Soerensens, indem wir die Lösungen, welche mittels Bariumchlorid und Barytwasser von Phosphaten und Carbonaten befreit waren, durch Tüpfeln auf das neutrale Azolithminpapier einstellten. Wir wagten davon nicht abzugehen, da Soerensen diese Methode empfahl, weil die natürlichen Aminosäuren eine Reaktion besitzen, die der durch das neutrale Azolithminpapier angezeigten am besten entspricht. Jedoch durch die obenerwähnten Unannehmlichkeiten des Azolithminpapiers bewogen, versuchten wir es auch hier mit dem Neutralrot und konnten uns, wie auch aus Tabelle X zu ersehen ist, davon überzeugen, daß der Unterschied zwischen Azolithmin und unserer Neutralrotneutralität zu gering ist, um das Gesamtergebnis der Titration zu beeinträchtigen, ja daß sogar einige höher komplexe Eiweißabbauprodukte, wie wir sie beispielsweise im Pepton Witte in Händen haben, gegen Azolithmin sowohl als auch gegen Neutralrot von Natur aus schwach alkalisch reagieren. Auch der Wert der Stadientitration[1]) wird nur in einer zu vernachlässigenden Weise beeinflußt.

Der Gang einer Analyse gestaltet sich nun folgendermaßen: Zur Entfernung der die Titration störenden Phosphate und Carbonate pipettiert man in ein 50-ccm-Meßkölbchen 40 ccm der zu analysierenden Flüssigkeit, fügt 1 g krystallisiertes, feingepulvertes Bariumchlorid und so viel gesättigtes Barytwasser hinzu, daß die Flüssigkeit auf Phenolphthalein stark alkalisch reagiert, wovon man sich durch Prüfen eines Tropfens auf frischem Phenolphthaleinpapier überzeugen kann. Es ist nötig, eine starke, alkalische Reaktion herzustellen, damit die Fällung der Phosphate und Carbonate quantitativ wird[2]). Liegen stark saure Lösungen vor, bei welchen das

[1]) V. Henriques und J. K. Gjaldbaek, Zeitschr. f. physiol. Chemie **75**, 363. 1911.

[2]) NB. in stark alkalischen Lösungen kann Phenolphtalein wieder farblos werden.

Digitized by Google

zur Verfügung stehende Volumen zur Neutralisation nicht ausreichen würde, so neutralisiert man mit normaler oder halbnormaler Lauge vor und setzt dann noch einen Überschuß an Barytwasser hinzu. Nach dem Auffüllen zur Marke mit dest. Wasser, läßt man 10 Minuten stehen und filtriert dann durch ein 11-cm-Filter in ein kleines Erlenmeyerkölbchen, wobei man tunlichst vermeidet, daß unnötig Kohlensäure der Luft einwirkt. Vom klaren Filtrat pipettiert man je 20 ccm in zwei Coloriskopgläschen und setzt sie zusammen mit der Neutralrotvergleichslösung in den Apparat ein. Gleichzeitig bereitet man sich die erforderlichen Formolmischungen. In zwei Erlenmeyerkölbchen pipettiert man je nach der Anzahl der auszuführenden Analysen mehr oder weniger 30—40 proz. Formaldehydlösung, beispielsweise 20 ccm, setzt zur einen 2 ccm Phenolphthaleinlösung (0,5 g im Liter 50 proz. Alkohols) und zur andern 2 ccm dest. Wasser. Das mit Indicator versetzte Kölbchen neutralisiert man bis zum eben wahrnehmbaren rötlichen Farbton zuerst mit $^n/_2$-, später mit $^n/_{10}$-Alkali und setzt dann der indicatorfreien Lösung die gleiche Menge $^n/_2$- und $^n/_{10}$-Alkali zu. Beide Lösungen werden, gut verschlossen, beiseite gestellt. Nun schreitet man zur Titration selbst. Zu den 20 ccm Analysenlösung links gibt man 2 ccm Neutralrotlösung und titriert mit $^n/_2$-Salzsäure bis nahe auf Farbengleichheit, worauf man auch rechts nach Zugabe von 2 ccm dest. Wasser mit der gleichen Menge $^n/_2$-HCl versetzt. Mit $^n/_{10}$-Natronlauge oder $^n/_{10}$-Salzsäure wird dann, je nachdem man sich auf der sauren oder alkalischen Seite des Neutralpunktes befand, auf Farbengleichheit titriert, wobei nach erfolgter Farbenübereinstimmung rechts und links die gleichen Mengen an Laugen bzw. Säure insgesamt verbraucht sein müssen. Jetzt gibt man links 10% des Flüssigkeitsvolumens an Phenolphthaleinlösung zu, während man rechts 2 ccm Neutralrotlösung zupipettiert. An Stelle der Neutralrotvergleichslösung setzt man die Vergleichslösung Stadium I mit einem Umschlagspunkt von $p_H = 8{,}3$, die durch Verdünnen von 1 Teil Vergleichslösung Stadium II mit 10 Teilen 90 proz. Alkohol hergestellt wurde. Rechts gibt man nun vorsichtig soviel $^n/_{10}$-Alkali hinzu, bis der rote Ton des Neutralrots einwandfrei dem gelben Platz gemacht hat, ohne allerdings einen wesentlichen Überschuß an Lauge zuzufügen und titriert dann links behutsam auf Farbengleichheit. Der rote Ton des Neutralrots wird immer schwächer, geht schließlich in Gelb über und kurz darauf beginnt der Indicator Phenolphthalein durch eine ganz geringe Rötung anzusprechen. Bevor Farbengleichheit erreicht ist, überzeugt man sich, daß rechts die gleiche Menge bzw. ein geringer Überschuß an Alkali zugegen ist als links, damit auf beiden Seiten völlig gleiche Verhältnisse herrschen und nicht am Ende rechts vom Neutralrot herrührend noch ein schwacher rötlicher Ton herrscht. Ist so Stadium I erreicht, so pipettiert man zuerst rechts 10 ccm indicatorfreies Formol zu und kann dann links mit der gleichen Pipette 10 ccm der mit Indicator versetzten ganz schwach roten Formollösung zusetzen. Nunmehr wird an Stelle der Vergleichslösung Stadium I jene Stadium-II-Phosphatvergleichslösung mit Umschlag bei $p_H = 9{,}18$ gesetzt. Die Lösungen haben durch den Zusatz des Formaldehydes, der mit den Amidogruppen reagierte und die Carboxyl-

Digitized by Google

gruppen zu ihrer vollen Entfaltung brachte, eine rote Farbe infolge der Gegenwart des Neutralrots angenommen. Man gibt deshalb rechts so viel $^n/_{10}$-Alkali zu, bis sich ein rein gelber Ton einstellt und titriert schließlich links auf Farbengleichheit.

Zum Beispiel:

Vorbereitung des Formolgemisches.

20 ccm Formol	20 ccm Formol
+ 2 ccm Phenolphthalein	+ 2 ccm Wasser
+ 0,50 ccm $^n/_2$-NaOH	+ 0,50 ccm $^n/_2$-NaOH
+ 1,10 ccm $^n/_{10}$-NaOH	+ 1,10 ccm $^n/_{10}$-NaOH

Analyse.

links:		rechts:
20 ccm Lösung		20 ccm Lösung
+ 2 ccm Neutralrotlösung		+ 2 ccm Wasser
+ 2,10 ccm $^n/_2$-Salzsäure		+ 2,10 ccm $^n/_2$-Salzsäure
– 0,49 ccm $^n/_{10}$-NaOH	← Neutralrot-neutralität →	+ 0,49 ccm $^n/_{10}$-NaOH
+ 2,5 ccm Phenolphthaleinlösung		+ 2 ccm Neutralrotlösung
+ 1,00 ccm $^n/_{10}$-NaOH	← Stadium I →	+ 1,2 ccm $^n/_{10}$-NaOH
+ 10 ccm Formolmischung		+ 10 ccm Formolmischung
+ 2,50 ccm $^n/_{10}$-NaOH		+ 2,5 ccm $^n/_{10}$-NaOH

Gesamtverbrauch:

3,50 ccm $^n/_{10}$-NaOH ← Stadium II → 3,70 ccm $^n/_{10}$-NaOH

Werden nicht die äußersten Anforderungen an die Genauigkeit der Methode gestellt, und sind die Lösungen nur unbedeutend gefärbt, wie dies durch die Behandlung mit Bariumchlorid und Barytwasser oft der Fall ist, so kann man anstatt rechts indicatorfreie Formolmischung zuzusetzen, auch durch Zufügen von 10 ccm ausgekochtem destilliertem Wasser auskommen und dadurch die Arbeitsweise sehr vereinfachen.

Es bleibt nun noch übrig, einen blinden Versuch mit der Formolmischung allein anzustellen, bei dem das Endvolumen mit dem bei der Titration erhaltenen möglichst nahe übereinstimmen soll. Man verfährt für unser Beispiel so, daß man 20 ccm ausgekochtes destilliertes Wasser in eines der Gläschen abpipettiert, 2,0 ccm Phenolphthaleinlösung und 10 ccm mit Indicator versetzte, auf ganz schwach Rot eingestellte Formolmischung zusetzt und schließlich noch mit ausgekochtem, destilliertem Wasser auf das bei der Titration entstandene Flüssigkeitsvolumen, in unserem Beispiel etwa 38 ccm, auffüllt. Dann wird sofort gegen die Vergleichslösung Stadium II titriert. Angenommen es wurden 0,30 ccm $^n/_{10}$-Alkali verbraucht,

Digitized by Google

so beträgt die tatsächlich zur Titration der Analyse verbrauchte Menge $^n/_{10}$-Alkali 3,50 — 0,30 = 3,20 ccm und das Verhältnis

$$\frac{\text{Stadium II}}{\text{Stadium I}} \text{ ist gleich } \frac{3{,}20}{1{,}00} = 3{,}2.$$

Wir verwendeten immer $^n/_{10}$-Natronlauge, erstens weil Barytlauge öfters Fällungen hervorruft, die bei der Titration im Coloriskop störend wirken und andrerseits bei etlichen Eiweißspaltungsprodukten mit Baryt größere Abweichungen von der Theorie auftreten. $^n/_{10}$- anstatt $^n/_5$-Natriumhydroxyd benützten wir deshalb, weil die Menge des verbrauchten Alkalis sich in unserm Falle immer nur in den Grenzen einiger weniger Kubikzentimeter bewegte, so daß eine zu große Verdünnung, wie sie mit Rücksicht auf eine vollkommene Reaktion zwischen den Aminogruppen und dem Formaldehyd zu vermeiden ist, für unseren Fall keineswegs in Betracht kam.

Als Beweis für die vortreffliche Brauchbarkeit dieser von uns abgeänderten Methode der Formoltitrierung, seien in Tab. II einige Titrationsergebnisse in $^n/_{10}$-NaOH mit reinen Lösungen mitgeteilt. Stadium II versteht sich abzüglich des blinden Versuchs. Zum Vergleich sind auch die von Soerensen mit seinem Titrationsverfahren ermittelten Werte angegeben.

Tabelle II.

Angewandte Lösung	Stadium II	Berechn.	Gefunden in % des Berechn.	Nach Soerensen m. $^n/_4$-Ba(OH)$_2$	Gefunden in % des Berechn.
20 ccm $^n/_{10}$-Glykokoll .	19,79	20	98,95	9,85[1])	98,5
20 „ $^n/_{10}$-Alanin . . .	19,84	20	99,20	9,80	98,0
20 „ $^n/_{10}$-Leucin . . .	19,84	20	99,20	9,70	97,0
20 „ $^n/_{20}$-Asparaginsäure	9,65	10	96,50	9,75	97,6
20 ccm 1 proz. Lösung von Pepton Witte	2,20	—	—	—	—

Nachdem nun die beiden Methoden der Säurebestimmung und der Formoltitration eine eingehende Würdigung gefunden haben, wollen wir uns der Beschreibung der Arbeitsweise bei Vorbereitung unseres Ausgangsmaterials zur Analyse zuwenden:

Die einzelnen Samen wurden zunächst auf einer Laboratoriumshandmühle, so fein es ging, zerkleinert, was bei den noch wasserreicheren oft mit großen Schwierigkeiten verknüpft war, da sich die Mühle sehr rasch verstopfte. Man mußte in diesem Falle nach Gewinnung einiger Gramme Mahlgut die Mühle jedesmal vor dem Weitermahlen gründlich reinigen. Samen mit 14—20% Wassergehalt machten meist keine Schwierigkeiten,

[1]) 20 ccm Flüssigkeitsvolumen.

Digitized by Google

besonders wenn man so verfuhr, daß man zuerst bei gröberem Gang der Mühle vorschrotete und das Grobschrot ein zweites Mal auf Feingrieß bzw. Mehl verarbeitete. Sofort nach Beendigung des Mahlens wurde das Mehl in eine gutschließende Pulverflasche gebracht, damit jeglicher Feuchtigkeitsverlust vermieden würde. Vom Mehl wurde dann in üblicher Weise eine Wasserbestimmung angesetzt, indem man 4—5 g $3^1/_2$—4 Stunden bei 102—104° C trocknete.

40 g des Mehles, welche auf einer empfindlichen Tarierwage auf zwei Dezimalen genau abgewogen wurden, maischte man in einem Becherglas mit 150 ccm destilliertem Wasser von 55—60° C ein und digerierte dann im Wasserbad bei einer Temperatur von 50° C[1]) 3 Stunden lang unter dauerndem Rühren. Um die Tätigkeit von Mikroorganismen hintanzuhalten, wurden jedesmal beim Einmaischen 0,5 ccm Toluol zugesetzt. Nach Beendigung der Digestion wurde der Rührer gut abgespült, der Becher auf Zimmertemperatur abgekühlt und auf 240 g mit dest. Wasser aufgewogen. Nach gründlichem Durchmischen filtrierte man durch ein Faltenfilter und goß das erste Filtrat noch einmal zurück. Vom Filtrat wurden in 20 ccm die Säure nach der oben erwähnten Methode auf Neutralrot und Phenolphthalein ermittelt. Ferner wurden 40 ccm mit Baryumchlorid und Barytwasser auf 50 ccm gebracht und in 20 ccm des Filtrates die Formoltitration ausgeführt.

Durch Digestion des Materials bei 50° C ermittelt man diejenige Säuremenge, welche unter dem Einfluß von enzymatischen Prozessen entsteht. Es ist jedoch von ebensolchem, wenn nicht vielleicht von noch größerem Interesse, zu erfahren, welche Säuremengen bereits als ursprünglich im Samen vorgebildet sind. Das heißt, man mußte ein Mittel finden, die Enzyme auszuschalten, ohne daß jedoch andere Prozesse davon in Mitleidenschaft gezogen würden und ohne daß störende Nebenreaktionen dabei aufträten. In unserer früheren Arbeit (loc. cit.) haben wir uns eingehend schon mit diesem Kapitel beschäftigt und die bestehenden Methoden, z. B. Abkochen mit Wasser (Kreis-Arragon), Extrahieren mit siedendem Alkohol (Hilger-Günther, Beythien) und andere einer Kritik unterzogen. Alle diese Verfahren sind unbrauchbar, da sie teilweise den Enzymen doch noch Gelegenheit zur Entfaltung ihrer Tätigkeit geben, teils infolge der Schwerlöslichkeit der anorganischen Phosphate in Alkohol zu niedrige Werte liefern oder eine Filtration unmöglich machen. Die Anwendung einer Extraktionstemperatur von 0° C, wie sie von W. Windisch[2]) empfohlen wird, scheiterte bei der großen Zahl von in verhältnismäßig sehr rascher Folge vorzunehmenden Analysen aus technischen Gründen. Die Extraktion ließe sich durch Verwendung von Eis als Kühlmittel noch ausführen, dagegen läßt sich die Filtration, welche bei gewöhnlicher Temperatur oftmals an 24 Stunden in Anspruch nahm, nur dann bei solch tiefer Temperatur bewerkstelligen, wenn ein dauernd auf 0° C eingestellter Raum

[1]) Annähernde Optimumtemp. für enzymat. Säurebildung (53°) und Eiweißabbau (46°).

[2]) Wochenschr. f. Brauerei 1918.

Digitized by Google

zur Verfügung steht, was bei uns leider nicht der Fall war. Ein gewöhnlicher Eisschrank, in dem durchschnittlich eine Lufttemperatur von etwa 5° C herrscht, ist jedenfalls nicht geeignet, da bei dieser Temperatur bei der langen Zeitdauer der Filtration doch für Ablauf enzymatischer Prozesse Gelegenheit geboten ist.

Das waren denn auch die Gründe, warum wir auch hier wieder auf das Mittel und die Methode zurückgriffen, welche sich schon bei unseren früheren Arbeiten bewährt hatten, nämlich die Abtötung des Materials mittels siedenden Alkohols nach dem Vorgang von Lintner-Mason[1]). Das Verfahren gestaltet sich folgendermaßen:

40 g des Mehles werden in einem Becherglas von etwa 400 ccm Inhalt mit so viel neutralem Alkohol von 90—95% übergossen, daß nach Durchtränkung des Mehles noch eine Schicht von etwa 1—1,5 ccm über demselben bestehen bleibt. Man setzt den Becher mit einem Uhrglas bedeckt in ein Wasserbad, das auf etwa 85° C erwärmt ist, und läßt den Alkohol gelinde sieden. Ist der Alkohol oberflächlich verdunstet, was etwa 10—15 Minuten erfordert, so steigert man die Wasserbadtemperatur auf etwa 90° und vertreibt unter tüchtigem Umrühren mit einem Glasstab, um Spritzen zu verhindern, den noch im Mehl steckenden Alkohol, bis die Masse trocken und krümelig wird. Man setzt unter gelegentlichem Umrühren das Erhitzen noch so lange fort, bis die Masse wieder das anfängliche mehlige Aussehen angenommen hat und beim Umrühren kein stechender Geruch nach Alkoholdämpfen mehr wahrnehmbar ist. Die gesamte Operation nimmt etwa 30—45 Minuten in Anspruch[2]). Bei sehr wasserreichem Material verwendet man entsprechend mehr Alkohol. Nach dem Abkühlen auf gewöhnliche Temperatur gibt man 150 ccm destilliertes Wasser und 0,5 ccm Toluol zu und läßt unter öfterem Durchrühren wenigstens 3 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur stehen. Längeres Digerieren als 3 Stunden hat keinerlei Einfluß auf das Resultat. Nach Aufwiegen auf 240 g wird filtriert und im Filtrat wie oben Säure- und Formoltitration vorgenommen.

Daß diese Methode der Abtötung des Materials mit siedendem Alkohol für den vorliegenden Zweck kein ideales Verfahren vorstellt, ist uns, das sei ausdrücklich betont, wohl bekannt. Der Hauptnachteil dieser Methode besteht darin, daß bei der hohen Temperatur von 80—90° C auch Eiweißkörper koaguliert werden. Dadurch werden jedoch sicherlich sekundäre Prozesse verursacht, welche auch auf die Acidität einen Einfluß ausüben. So haben Chick und Martin[3]) in eingehender Weise gezeigt, wie mit der Koagulation von Eiweiß eine Abnahme der aktuellen Acidität einhergeht. Die Gründe mögen sowohl in einer chemischen Bindung oder auch in einer Adsorption von sauren Bestandteilen durch das koagulierende Eiweiß

[1]) Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen **26**, 457. 1903.

[2]) Es sei noch erwähnt, daß manche Enzyme zur völligen Abtötung mitunter ein dreistündiges Kochen mit Alkohol am Rückflußkühler bedürfen.

[3]) Kolloidchem. Beihefte **5**, 49. 1913.

Digitized by Google

liegen[1]). Wir vergewisserten uns durch einen Versuch über die bezüglich der Titrationsacidität obwaltenden Verhältnisse: Ein wässeriger Extrakt, aus Malz durch Maischen bei 50° C während $2^1/_2$ Stunden hergestellt, verbrauchte für 50 ccm 11,81 ccm $^n/_{10}$-NaOH gegen Phenolphthalein. Eine Probe, welche 10 Minuten am Rückflußkühler gekocht und nach dem Abkühlen auf das ursprüngliche Gewicht wieder aufgefüllt war, wurde vom koagulierten Eiweiß abfiltriert und verbrauchte nunmehr nur 11,36 ccm $^n/_{10}$-Lauge für 50 ccm Lösung. Es ist auch nicht von der Hand zu weisen, daß die Eiweißkörper selbst infolge ihrer amphoteren Natur bei der Titration gegen Phenolphthalein eine geringe Menge Alkali verbrauchen, so daß man, ohne eine chemische Bindung oder Adsorption von sauren Lösungsbestandteilen zu vindizieren, auch lediglich durch die Abnahme einer Säurekomponente infolge der Koagulation, den Verlust an Säure erklärlich machen kann. Daß die Eiweißkörper gegen Phenolphthalein mehr oder weniger schwach sauer reagieren, findet eine gewisse Analogie darin, daß ein Teil ihres Gesamtstickstoffes, etwa 2—8%, formoltitrierbar ist. Es wird also auch bei der Formoltitration ein Unterschied wahrzunehmen sein, je nachdem man die Flüssigkeit vor der Titration zur Koagulation der Eiweißkörper erhitzt hat oder nicht. Ein diesbezüglicher Versuch an Gerste ergab, daß sich auf 100 g Gerstentrockensubstanz eine 6,64 ccm Normallauge entsprechende Stickstoffmenge in üblicher Weise formoltitrieren läßt. Koaguliert man den Extrakt während 15 Minuten im kochenden Wasserbad und führt dann wie üblich die Titration aus, so werden nur mehr 6,44 ccm Normalalkali verbraucht, es hat demgemäß ein Verlust an formoltitrierbarem Stickstoff von etwa 3% stattgefunden.

Ein weiteres Argument gegen die Methode des Abkochens mit Alkohol ist, daß mit dem Abdampfen des Alkohols auch flüchtige Fettsäuren mit entweichen und dadurch die Resultate zu niedrig ausfallen könnten. Wir haben uns durch folgende Versuche auch in dieser Richtung orientiert. Einmal wurden 40 g Gerstenmehl, das andere Mal 40 g Weizenmehl in Kjeldahlkolben mit 75—80 ccm neutralem 96 proz. Alkohol übergossen und im kochenden Wasserbad derart abdestilliert, daß der Kolben bis zum oberen Halsrand von Dampf umgeben war. Die überdestillierenden Alkoholdämpfe wurden durch einen Liebigkühler kondensiert und in einer Vorlage aufgefangen. Die Dauer der Destillation betrug jedesmal $1^1/_2$ Stunden, Alkohol ging nach dieser Zeit keiner mehr über, wenngleich auch der Destillationsrückstand noch ein schwach feuchtes Aussehen hatte. Der übergegangene Alkohol war in beiden Fällen gegen Neutralrot alkalisch und gegen Phenolphthalein sauer. Das Destillat der Gerste verbrauchte gegen diesen Indicator 0,80 ccm $^n/_{10}$-Alkali, jenes des Weizens 0,72 ccm. Es sind somit auf keinen Fall stärkere Säuren übergegangen, sonst wäre das Destillat gegen Neutralrot sauer gewesen. Es scheint sich hier um ganz

[1]) Nach S. P. L. Soerensen (Compt. rend. d. trav. d. Lab. d. Carlsbg. **10**, 41 1911) ist die Veränderung der H-Ionenkonzentration auf die Konzentrationsveränderung des Eiweißes bei der Koagulation zurückzuführen.

Digitized by Google

schwach saure organische Stoffe von den Schwefelverbindungen ähnlicher Beschaffenheit zu handeln, der eigenartige Geruch, der jedesmal beim Extrahieren von Gerste mit heißem Alkohol oder auch anderen organischen Lösungsmitteln auftritt, ließe darauf schließen.

Trotz dieser unvermeidlichen Nachteile, die diese Methode auch an sich hat, haben wir uns dennoch entschlossen, sie zu verwenden, da sie einerseits sehr gut reproduzierbare Werte liefert, wovon wir uns oftmals überzeugen konnten, und sich außerdem rasch und sicher ausführen läßt, wenn es sich um Anstellung einer größeren Reihe gleichzeitiger Analysen handelt. Als Belege für die Reproduzierbarkeit der Werte sind aus einer größeren Anzahl nur die folgenden angeführt:

40 g feingeschroteter Hafer (Gotenhafer) wurden einmal bei 50° C und das andere Mal nach Abtötung mit Alkohol bei gewöhnlicher Temperatur digeriert und nach den erwähnten Methoden Säure und formoltitrierbarer Stickstoff in den Extrakten bestimmt. Beide Versuche wurden von Anfang an doppelt ausgeführt. In je 20 ccm wurden gefunden im Kubikzentimeter $^{n}/_{10}$-Alkali:

	Abgetötet		bei 50° digeriert	
	Versuch a	Versuch b	Versuch a	Versuch b
Säure gegen Neutralrot	0,43	0,47	0,94	0,97
Säure gegen Phenolphthal.	1,14	1.16	3.08	3,12
Formoltitration:				
Stadium I. . . .	0,33	0,36	0,74	0,73
Stadium II . . .	1,14	1,17	2,68	2,72
Blinder Versuch . .	0,25	0,26	0,24	0,26

Daraus erhellt, daß die Methode innerhalb der zulässigen analytischen Fehlergrenzen liegende Resultate liefert. Selbstverständlich ist dabei vorausgesetzt, daß man immer unter gleichen Versuchsbedingungen arbeitet und besonders die Temperatur von 50° C bei der Digestion genau einhält.

Einige Worte sind noch über eine etwaige Fehlerquelle bei der Formoltitration zu erwähnen.

L. de Jager[1]) hatte auf die störende Wirkung von Ammoniumsalzen bei der Formoltitrierung hingewiesen und Soerensen[2]) hatte bald darauf die Beobachtungen de Jagers bestätigt und geprüft. Es zeigte sich nämlich, daß, obgleich Ammonsalze und Aminosäuren einzeln quantitativ sich formoltitrieren lassen, bei gleichzeitigem Vorhandensein beider die Resultate mehr oder minder hinter der berechneten Summe zurückbleiben. Vermutlich spielt dabei eine Nebenreaktion eines Zwischenproduktes aus Ammoniak und Formaldehyd mit Aminosäuren eine Rolle. Wie aus Soerensens Versuchen hervorgeht, ist jedoch nur bei Anwesenheit bedeutender Mengen von Ammonsalzen neben den Aminosäuren dieser Fehler in Be-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **63**, 333. 1909.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **64**, 120. 1910.

Digitized by Google

tracht zu ziehen. Um auch für unsern Fall sicher zu gehen, stellten wir einen Versuch an, der uns über die Menge des Ammoniakstickstoffes in unsern Extrakten orientieren sollte. Den Ammoniakstickstoffgehalt bestimmten wir nach der Methode der Vakuumdestillation, wie sie von D. D. van Slyke[1]) gehandhabt wird. Um das lästige Schäumen zu verhindern, setzten wir der Destillationsflüssigkeit 1—2 Tropfen sekundären Oktylalkohol von Kahlbaum zu, der sich als schaumzerstörendes Mittel aufs beste bewährte. Von dem tadellosen Funktionieren der Apparatur überzeugten wir uns durch einen Probeversuch:

10 ccm $^n/_{10}$-Ammonsulfatlösung mit 40 ccm Wasser und 10 ccm gesättigter Barytlauge $^1/_2$ Stunde im Vakuum bei einer Wasserbadtemperatur von 40—45° C destilliert lieferten

$$9{,}99 \text{ ccm } {}^n/_{10}\text{-}NH_3.$$

40 g Gerste mit einem Wassergehalt von 14,41% wurden sodann wie üblich nach Alkoholbehandlung und bei 50° mit Wasser digeriert, auf 240 g aufgewogen und in 40 ccm des Filtrates unter Zusatz von 15 ccm Barytwasser das Ammoniak im Vakuum abdestilliert. Das enzymgetötete Material ergab 0,42 ccm Normal-NH_3, das bei 50° C digerierte 0,95 ccm Normal-NH_3 in 100 g Trockensubstanz. Die Menge des formoltitrierbaren Stickstoffs entsprach gleichzeitig 2,61 bzw. 5,01 ccm Normalalkali in 100 g Trockensubstanz, so daß 16 bzw. 19% des formoltitrierbaren Stickstoffes in Form von Ammoniak vorlagen. Daraus ergibt sich, daß sich der Gehalt an Ammoniak in Grenzen bewegt, für welche der oben erwähnte Fehler ohne praktische Bedeutung ist.

In dem gleichzeitigen Vorkommen von Ammoniak neben Aminosäuren mag auch die Ursache zum Teil liegen, daß die zweite Methode der Amidstickstoffbestimmung, nämlich die von D. D. van Slyke[1]) nicht genau mit der Formoltitration übereinstimmende Werte liefert. Da es von Interesse ist, sich über die gleichzeitige Anwendbarkeit beider Methoden Klarheit zu verschaffen, sind in folgender Tabelle die Angaben über die Reagierfähigkeit der einzelnen Eiweißabbauprodukte und verwandter Körper nach der einen und andern Methode zusammengestellt.

Als Hauptunterschied beider Methoden ergibt sich, daß bei der Formoltitration im Gegensatz zur Methode von van Slyke, Ammoniak quantitativ und α-Prolin annähernd quantitativ bestimmt werden, während nach van Slyke Ammoniak in der üblichen Zeit des Reaktionsverlaufes von 5—10 Minuten nur mit 15—20% seines Stickstoffs reagiert und das α-Prolin gänzlich unbeeinflußt bleibt. Das Lysin reagiert nach der Methode von van Slyke mit zwei Stickstoffatomen, hingegen bei der Formoltitration nur mit einem. Diese Verhältnisse sind sicherlich die Ursache, daß ein und derselbe Extrakt nach van Slyke oder

[1]) Handb. d. Biochem. Arbeitsmethoden V. 2. 1000.

Digitized by Google

Tabelle III.

Substanz	Anzahl N-Atome i. Molekül	Bei der Formoltitration[1]) reagier. Anzahl N-Atome	Mit einer Ausbeute in % d. Theorie	Nach van Slyke reagier. Anzahl N-Atome	Mit einer Ausbeute in % der Theorie
Glykokoll	1	1	98,5	1	103
Alanin	1	1	98	1	quantitativ
Leucin	1	1	97	1	"
Asparaginsäure	1	1	96,5	1	"
Glutaminsäure	1	1	99,5	1	"
Lysin	2	1	92,5	2	in 1/3 Stunde quantitativ
Serin	1	1	99	1	quantitativ
Asparagin	2	1	99	1	"
Glutamin	2	1	101	1	"
Histidin	3	1	89	1	"
Phenylalanin	1	1	99,5[2])	1	"
α-Prolin	1	1	80	—	—
Tyrosin	1	1	109	1	quantitativ
Guanidin	3	—	—	—	—
Kreatin	3	—	—	—	—
Kreatinin	3	—	—	—	—
Arginin	4	1	100,5	1	quantitativ
Tryptophan	2	1	?	1	"
Cystin	2	2	?	2	"
Harnstoff	2	—	—	2	in 8 St. quant. in 1 St. 50%
Ammoniumchlorid	1	1	99	1	in 5 Min. 15%

mit Hilfe der Formoltitration analysiert, immer etwas verschiedene Werte für den Amidstickstoff liefert. Denn Ammonsalze sind, wie auch oben gezeigt, immer in den Extrakten von Samen anwesend und die Gegenwart von α-Prolin und des ihm naheverwandten Oxyprolins darf wohl sicher angenommen werden, nachdem gerade diese beiden Eiweißabbauprodukte als Bausteine der Reserveeiweißstoffe in den Samen in ziemlich beträchtlicher Menge gefunden wurden. (Osborne, van Slyke, Abderhalden.) Lysin ist meist in geringerer Menge vorhanden.

Einige Versuche, die wir zur Klärung obiger Verhältnisse anstellten, zeitigten folgende Ergebnisse:

1 proz. Lösung von Wittes Pepton: 10 ccm enthielten

nach Formoltitration 0,001538 g Amid-N.
nach van Slyke 0,001530 g Amid-N.

[1]) Mit Phenolphthalein als Indicator.
[2]) Mit NaOH titriert.

Digitized by Google

10 ccm eines Hydrolysengemisches, gewonnen durch Hydrolyse des Eiweißkörpers „Bynin" mit ca. 25% NH_3 und ca. 10% Prolin und Oxyprolin enthielten

nach Formoltitration 0,0112 g Amid-N.
nach van Slyke 0,0085 g Amid-N.

20 ccm eines unserer Gerstenextrakte enthielten

nach Formoltitration 0,00437 g Amid-N.
nach van Slyke 0,00375 g Amid-N.

20 ccm eines Hydrolysengemisches aus Gelatine (frei von NH_3!) enthielten

nach Formoltitration 0,00973 g Amid-N.
nach van Slyke 0,00905 g Amid-N.

Zum Schlusse dieser Betrachtungen sei noch ein Wort der Art der Berechnung unserer Ergebnisse gewidmet.

Alle durch die eingangs erwähnten Methoden erhaltenen Werte, ausgedrückt in Kubikzentimeter $^n/_{10}$-Alkali berechneten wir durchwegs als Kubikzentimeter Normalalkali bezogen auf 100 g Samentrockensubstanz nach folgender der Proportionalitätsmethode angepaßten Formel:

Ist m = verbrauchte Anzahl ccm $^n/_{10}$-Alkali,
R = die zugewogene Wassermenge in g,
W = g Wasser in 100 g Substanz (Wassergehalt in Prozent),
C = abgewogene Menge Substanz in g,
F = zur Titration verwendetes Filtrat in ccm[1]),

so ist die Säuremenge Sr in ccm Normalalkali auf 100 g Trockensubstanz bezogen

$$Sr = 10 \cdot m \cdot \frac{R + W \cdot \frac{C}{100}}{F(C - W)}$$

Zur Berechnung der bei der Formoltitration gefundenen Werte ist obiger Ausdruck noch mit 1,25 zu multiplizieren, da bei Vorbereitung der Analyse zwecks Abscheidung der Phosphate 40 ccm auf 50 ccm verdünnt wurden. Für den Ausdruck „Kubikzentimeter Normalalkali" verwenden wir, ähnlich wie für $^1/_{1000}$ g Molekül die Abkürzung „Millimol" gebräuchlich ist, die Bezeichnung „Millival", herrührend von $^1/_{1000}$ Äquivalent. Auch die bei der Formoltitration ermittelten Werte geben wir durchwegs als „Millival" an, da sich die engere Beziehung zur Säure durch diese Art der Ausdrucksweise leichter erkennen und überblicken läßt. Außerdem steht diese Ausdrucksweise in bestem Einklang mit dem der Formoltitration zugrunde liegendem Prinzip, indem wir ja mit dieser Methode immer nur tatsächlich Karboxylgruppen bestimmen, welche einer äquivalenten Amidogruppe entsprechen. Denn über die Menge des bei einer Eiweißhydrolyse in Freiheit gesetzten Totalstickstoffes, wie er z. B. im Arginin, Histidin Glutamin usw. zutage tritt, gibt uns die Formoltitration direkt keinen Aufschluß.

[1]) Bei dem niederen Trockensubstanzgehalt kann ohne beträchtlichen Fehler mit dem Volumen an Stelle des Gewichts der Lösung gerechnet werden.

Digitized by Google

Die Versuchsergebnisse und ihre Erörterung.

Das gesamte Untersuchungsmaterial wurde uns in entgegenkommendster Weise von Herrn Professor Dr. L. Kiessling, Leiter der Saatzuchtanstalt in Weihenstephan, zur Verfügung gestellt.

Von den einzelnen Cerealien standen uns jeweils zwei Proben zur Verfügung, eine vom Stadium der späteren Gelbreife, die andere vom vollreifen Stadium, bei welchem unmittelbar nach der Probenahme, die Ernte erfolgte. Spätere Gelbreife und Vollreife trennte zeitlich ein Zwischenraum von 3 bis höchstens 4 Tagen. Nur bei der Wintergerste V_6 war die gelbreife Probe einige Tage früher entnommen. Mit Ausnahme der Gerste Ng_4 kamen sämtliche Proben spätestens 8 Tage nach der Probenahme zur Analyse. Bei den vollreifen Proben wurde nach einer Lagerung von 2 Monaten die Untersuchung wiederholt, um einen Einblick in die Verhältnisse der Nachreife zu bekommen. Besonders erwähnt sei noch, daß die Mehrzahl aller Sorten durch Züchtung reiner Linien erhalten wurde. Reine Linien sind in Gersten: Ng_4, Fg_2, Hado, Hilde, von Weizen: D, von Hafer: Weihenstephaner-Goten -Strubes. Es liegt also in den meisten der einzelnen Sorten keine Mischung und Population verschiedener Arten vor, sondern die einzelnen Sorten stellen die blütenreine, durch Selbstbefruchtung gewonnene Nachkommenschaft einer einzigen homozygotischen Ausgangspflanze dar. Es ist klar, daß dadurch die Versuchsergebnisse nur gewinnen können, da man etwaige Unterschiede in denselben den einzelnen Arten als charakteristisch zuschreiben darf.

Die Ergebnisse der einzelnen Versuche, soweit sie sich auf Säure, Formoltitration, Wassergehalt und Keimfähigkeit erstrecken, sind in den Tabellen I—IV zusammengestellt. Alles Wissenswerte ist darin erläutert, so daß sich ein weiterer Kommentar dazu erübrigt.

Anschließend an die Tabellen I—IV sei zur näheren Betrachtung der Versuchsergebnisse übergegangen. Da ergibt sich als erstes einheitliches und bei allen untersuchten Getreidearten immer wiederkehrendes Resultat, daß sowohl die ursprünglich vorhandene Säuremenge als auch die ursprünglich vorhandenen formoltitrierbaren Substanzen eine stetige Abnahme von der späteren Gelbreife zur Vollreife und darüber hinaus während der Lagerung erfahren. Von der späteren Gelbreife zur Vollreife ist diese Abnahme augenfälliger, um dann während der langsamen Nachreife bis zur vollen Keimreife in geringerem Maße sich bemerkbar zu machen. Man könnte hier nun sogleich vermuten, die Abnahme dieser beiden Gruppen sei nur eine scheinbare und dadurch bedingt, daß andere Kornsubstanzen, z. B. die Stärke noch eine wesentliche Zunahme von der späteren Gelbreife zur Vollreife erfahren, während Säure und formoltitrierbare Säure von einer weiteren Zunahme nicht mehr betroffen werden. Es müßte dann auf das Korn selbst bezogen, sogar zu einer Zunahme oder wenigstens zu einer Konstanz dieser Werte kommen. Die Betrachtungen haben sicherlich ihre Berchtigung, wenn man besonders frühere Reifestadien, z. B. das

Digitized by Google

Tabelle I. Gersten.

Varietät	Reifestadium	Wassergehalt in %	100 g Trockensubstanz enthalten Millival: ursprünglich vorhandene Säure: Neutralrot	ursprünglich vorhandene Säure: Phenolphthalein	ursprünglich vorhandene Säure: Neutralrot %	ursprünglich vorhandene formoltitr. Säure: Stad. I	ursprünglich vorhandene formoltitr. Säure: Stad. II	ursprünglich vorhandene formoltitr. Säure: V	durch Digestion entstandene Säure: Neutralrot	durch Digestion entstandene Säure: Phenolphthalein	durch Digestion entstandene Säure: Neutralrot %	durch Digestion entstandene formoltitr. Säure: Stad. I	durch Digestion entstandene formoltitr. Säure: Stad. II	durch Digestion entstandene formoltitr. Säure: V	Zuwachs durch Digestion an: I. Säure	Zuwachs durch Digestion an: II. formoltitrierbare Säure	Zuwachs durch Digestion an: Summe I u. II	Keimfähigkeit in %
Hildegerste	Gelbreif	18,32	1,86	4,40	42,3	2,12	4,66	2,2	4,07	13,22	37,8	4,66	10,59	4,4	8,82	5,93	14,75	15
	Vollreif	17,36	0,84	3,85	21,8	1,25	2,92	2,3	3,34	11,36	29,5	1,67	4,60	2,8	7,51	1,68	9,19	56
	2 Monate gelagert	14,41	0,71	3,40	20,9	1,40	2,61	1,9	3,53	11,55	30,6	2,41	5,01	2,1	8,15	2,40	10,55	95
	4 Tage gekeimt	7,29	0,93	4,58	20,3	1,46	5,84	4,0	3,62	12,24	29,6	2,00	9,68	4,8	7,66	3,84	11,50	—
Fg 2	Gelbreif	16,16	0,99	3,45	28,7	1,64	3,08	1,88	4,44	12,33	35,7	3,29	6,78	2,1	8,88	3,70	12,58	96
	Vollreif	16,57	0,83	3,57	23,3	1,45	2,90	2,0	3,64	12,89	28,2	2,07	7,02	3,4	9,32	4,12	13,44	100
	2 Monate gelagert	14,63	0,80	3,47	23,1	1,41	2,82	2,0	3,70	12,65	29,3	2,85	6,64	2,3	9,18	3,82	13,00	100
Ng 4	Gelbreif	17,96	0,67	3,20	20,9	0,84	2,11	2,5	3,37	11,12	30,3	1,69	5,27	3,1	7,92	3,16	11,08	84
	Vollreif	19,35	0,52	2,93	17,7	0,64	1,93	3,0	3,27	11,35	28,8	1,72	5,16	3,0	8,42	3,23	11,65	91
Hadogerste	Gelbreif	16,57	1,32	4,79	27,4	4,96	7,44	1,5	4,13	12,89	32,1	3,72	7,85	2,1	7,10	0,41	7,51	40
	Vollreif	17,27	1,00	4,01	25,0	2,50	6,88	2,7	3,17	11,01	28,7	3,13	7,73	2,5	7,00	0,85	7,85	44
	dgl. 18h bei 38—40° an der Luft getrocknet	8,61	0,98	3,58	27,4	0,83	1,93	2,3	3,27	10,40	31,4	2,66	6,13	2,4	6,82	4,20	11,02	72
	dgl. u. Luftabschluß	15,25	0,71	3,14	22,6	1,01	2,23	2,2	3,25	10,39	31,4	2,03	5,48	2,7	7,25	3,25	10,50	68
Wintergerste V_6	Gelbreif	33,20	0,49	2,93	16,7	0,76	2,80	3,7	1,06	8,39	12,6	1,28	4,18	3,3	5,46	1,38	6,84	0
	Vollreif	27,30	0,44	2,84	15,5	2,18	4,62	2,1	0,97	9,91	9,8	2,78	9,48	3,4	7,07	4,86	11,95	2
	3 Wochen gelagert	15,00	0,36	2,40	15,0	1,33	3,20	2,4	1,00	8,70	11,5	1,55	5,10	3,3	6,30	1,90	8,20	50
	dgl. 12h bei 40° getrocknet	11,30	0,30	2,29	13,1	0,96	2,60	2,7	0,82	7,63	10,7	1,19	4,30	3,6	5,34	1,70	7,04	69
	dgl. 2 Mon. gelagert	15,00	0,49	2,04	23,0	1,42	2,43	1,7	2,43	8,25	29,4	2,63	5,46	2,1	6,21	3,03	9,24	100

Digitized by Google

Tabelle II. Weizen.

Varietät	Reifestadium	Wassergehalt in %	100 g Trockensubstanz enthalten Millival: ursprünglich vorhandene Säure: Neutralrot	Phenolphthalein	Neutralrot %	ursprünglich vorhandene formoltitr. Säure: Stad. I	Stad. II	V	durch Digestion entstandene Säure: Neutralrot	Phenolphthalein	Neutralrot %	durch Digestion entstandene formoltitr. Säure: Stad. I	Stad. II	V	Zuwachs durch Digestion an: I. Säure	II. formoltitrierbare Säure	Summe I u. II	Keimfähigkeit in %
Strubes Kreuzung	Gelbreif	14,32	1,19	5,68	21,0	1,80	3,81	2,1	3,21	10,78	29,8	2,81	7,82	2,8	5,10	4,01	9,11	41
	Vollreif	15,15	0,32	2,43	13,6	1,30	3,12	2,4	1,88	7,71	24,4	2,03	5,67	2,8	5,28	2,55	7,73	15
	dgl. 2 Mon. gelagert	15,81	0,16	1,47	10,9	0,82	1,64	2,0	1,70	7,91	21,5	2,25	5,52	2,4	6,44	3,88	10,32	88
Weizen L	Gelbreif	14,39	0,80	3,75	31,3	1,20	3,01	2,5	2,89	9,95	29,1	2,73	6,34	2,3	6,20	3,30	9,53	49
	Vollreif	14,93	0,59	3,18	18,8	1,21	2,83	2,3	1,45	6,94	20,9	1,82	5,17	2,8	3,76	2,34	6,10	33
	dgl. 2 Mon. gelagert	15,21	0,23	2,18	10,5	1,22	2,64	2,2	1,62	7,46	21,6	1,83	4,87	2,7	5,28	2,23	7,51	98
Weizen D	Gelbreif	13,92	0,70	3,79	18,5	1,79	3,98	2,2	2,55	10,20	25,0	2,99	7,37	2,5	6,41	3,39	9,80	30
	Vollreif	17,25	0,17	2,01	8,5	1,67	3,13	1,9	2,00	8,17	24,6	2,09	5,21	2,5	6,16	2,08	8,24	34
	dgl. 2 Mon. gelagert	15,87	0,16	1,63	10,0	1,02	2,25	2,2	1,96	8,02	24,4	2,05	5,12	2,5	6,39	2,87	9,26	89

Tabelle III. Hafer.

Varietät	Reifestadium	Wassergehalt in %	100 g Trockensubstanz enthalten Millival: ursprünglich vorhandene Säure: Neutralrot	Phenolphthalein	Neutralrot %	ursprünglich vorhandene formoltitr. Säure: Stad. I	Stad. II	V	durch Digestion entstandene Säure: Neutralrot	Phenolphthalein	Neutralrot %	durch Digestion entstandene formoltitr. Säure: Stad. I	Stad. II	V	Zuwachs durch Digestion an: I. Säure	II. formoltitrierbare Säure	Summe I u. II	Keimfähigkeit in %
Gotenhafer	Gelbreif	14,3	1,28	4,00	32	1,80	4,00	2,2	3,43	10,96	31,9	3,20	10,41	3,3	6,96	6,41	13,37	17
	Vollreif	13,56	1,09	3,64	30	1,39	3,57	2,6	2,86	9,52	30	2,78	8,72	3,3	5,88	5,15	11,03	38
	dgl. 2 Mon. gelagert	11,26	0,77	3,08	25	1,15	3,08	2,7	2,92	8,92	32,8	2,69	9,04	3,0	5,84	5,96	11,80	91
Strubes Hafer	Gelbreif	12,73	0,94	3,29	28,8	1,49	4,04	2,7	3,45	10,51	32,8	3,14	11,57	3,7	7,22	7,43	14,65	0
	Vollreif	13,65	0,32	2,38	13,5	0,87	2,46	3,1	2,54	9,85	25,8	3,18	11,32	3,5	7,47	8,86	16,23	15
	dgl. 2 Mon. gelagert	14,39	0,26	2,02	12,9	0,88	2,29	2,6	2,46	10,96	22,4	3.28	11,43	3,5	8,94	9,14	18,08	46
Weihenstephaner Gelbhafer	Gelbreif	13,74	1,27	3,50	36,3	1,39	3,78	2,7	2,54	9,22	27,5	2,78	9,74	3,5	5,72	5,96	11,68	0
	Vollreif	14,00	0,70	2,61	26,8	1,40	3,19	2,3	2,71	9,09	29,8	2,79	8,79	3,2	6,48	5,60	12,08	34
	dgl. 2 Mon. gelagert	14,52	0,32	2,09	15,3	1,21	2,81	2,3	2,57	8,84	29,1	3,41	8,84	2,6	6,75	6,03	12,78	85

Digitized by Google

Tabelle IV. Roggen.

Varietät	Reifestadium	Wassergehalt in %	100 g Trockensubstanz enthalten Millival														Zuwachs durch Digestion an			Keimfähigkeit in %
			ursprünglich vorhandene							durch Digestion entstandene										
			Säure			formoltitr. Säure				Säure			formoltitr. Säure							
			Neutralrot	Phenolphthalein	Neutralrot %	Stad. I	Stad. II	V		Neutralrot	Phenolphthalein	Neutralrot %	Stad. I	Stad. II	V		I. Säure	II. formoltitrierb. Säure	Summe I u. II	
Lochows Petkuser	Gelbreif	15,34	1,30	5,26	24,8	2,03	5,08	2,5		2,99	7,79	38,4	3,74	7,92	2,1		2,53	2,84	5,37	2
	Vollreif	18,57	0,70	4,59	15,2	1,48	4,22	2,8		2,03	11,83	17,10	2,97	8,66	2,9		7,24	4,44	11,68	51
	dgl. 2 Monate gelagert	16,67	0,65	4,56	14,0	1,32	4,18	3,2		2,11	12,31	17,1	3,52	9,01	2,6		7,75	4,38	12,58	52
Jägers Champagner	Gelbreif	15,39	2,28	6,83	33,5	1,60	5,08	3,2		2,93	11,06	26,5	3,25	7,52	2,3		4,23	2,44	6,67	0
	Vollreif	13,57	0,63	3,64	17,3	1,39	3,17	2,3		2,54	11,10	22,9	2,38	7,53	3,2		7,46	4,36	11,82	49
	dgl. 2 Monate gelagert	16,83	0,32	3,56	9,0	1,22	3,04	2,5		1,95	10,70	18,2	2,43	7,50	3,1		7,14	4,46	11,60	48
Kartoffel.																				
—	am 2. Sept.	80,35	7,09	35,46	20,0	8,78	43,9	5,0		8,67	55,17	15,7	15,76	56,16	3,6		19,71	12,26	31,97	—
—	am 14. Okt.	76,41	4,58	20,27	22,6	5,23	20,43	4,7		6,01	24,70	24,4	10,01	31,70	3,2		4,43	11,27	15,70	—

Digitized by Google

der Grünreife oder früheren Gelbreife mit in den Kreis der Untersuchungen zieht. Für den vorliegenden Fall jedoch, mag dieser Einwand damit entkräftigt werden, daß zwischen Gelbreife und Vollreife meist 3, höchstens 4 Tage Unterschied lagen, ferner durch die Bestimmung einiger Tausendkorngewichte zur späteren Gelb- und Vollreife:

Tausendkorngewichte in Trockensubstanz:

	Gelbreif	Vollreif
Weizen Strubes Kreuzung .	38,1	38,3
Weizen L	35,1	36,4
Strubes Hafer	29,5	31,9

Daraus geht hervor, daß die Substanzzunahme aufs Korn berechnet von der Gelbreife zur Vollreife in unseren Fällen sich in sehr engen Grenzen bewegt und keineswegs von einer Größenordnung ist, daß sich die beobachtete Abnahme der Säure und der formoltitrierbaren Körper aufs Korngewicht bezogen in eine Konstanz verwandeln oder gar in eine Zunahme umkehren würde.

Die Größe der beobachteten Abnahme ist bei den einzelnen Gruppen wie Gersten, Weizen usw. verschieden groß und wechselt auch innerhalb der Gruppen bei den einzelnen Arten. Im allgemeinen läßt sich behaupten, daß die Abnahme der beiden Faktoren um so größer ist, je größer die Fortschritte sind, welche das Korn vom einen zum anderen Stadium bezüglich des Reifegrades gemacht hat. So finden wir z. B. bei der Hadogerste, welche, wenigstens aus der Keimfähigkeit zu schließen, im Stadium der späteren Gelbreife und Vollreife keine größeren Unterschiede in ihrem Reifezustand aufweist, eine Abnahme der Säure von 4,79 auf 4,01 und der formoltitrierbaren Säure von 7,44 auf 6,88 Millival, während andererseits bei der Hildegerste, welche von der Gelbreife zur Vollreife einen merklichen Fortschritt gemacht hat, entsprechende Werte von 4,40 abnehmend auf 3,85 für die Säure und 4,66 abnehmend auf 2,95 M. V. für die Formoltitration gefunden wurden.

Die Gerste Fg_2 nimmt in der Reihe der Gersten dadurch eine Sonderstellung ein, daß sie besonders früh keimreif ist. Eine gute Bestätigung findet diese praktische Tatsache in den analytischen Befunden, welche keine merklichen Unterschiede zwischen Gelbreife und Vollreife mehr erkennen lassen, es hatte auch die Gelbreife Probe schon fast die gleiche hohe Keimfähigkeit wie die vollreife Probe. Auch eine zweimonatliche Lagerung änderte an diesen Verhältnissen nichts mehr.

Ähnlich liegen die Verhältnisse für die Gerste Ng_4, welche zwar keine frühkeimreife Gerste ist, jedoch durch besondere Umstände erst 4 Wochen nach der Probenahme analysiert werden konnte, während, wie erwähnt, bei den anderen Proben die Untersuchung längstens 8 Tage nach der Ernte erfolgt war. Durch die vierwöchentliche Lagerung hatten sich beide Proben, die gelbreife und die vollreife so ziemlich ausgeglichen, wie aus den Keimfähigkeitszahlen und den analytischen Befunden klar zu ersehen ist. Die gelbreife Probe hat also die gleiche Nachreife durchgemacht wie die vollreife.

Digitized by Google

Die Wachstumsintensität der beiden Gersten Ng_4 und Fg_2 war allerdings eine verschiedene. Die nach sechstägiger Keimung unter gleichen Bedingungen ermittelten Wurzelgewichte geben darüber Aufschluß:

Wurzelgewicht:

	Gelbreife	Vollreife
Gerste Fg_2	0,505 g	0,651 g
Gerste Ng_4	0,275 g	0,320 g

Man sieht daraus klar, wie viel energischer die frühkeimreife Gerste Fg_2 schon bald nach der Ernte keimte im Gegensatz zu der 4 Wochen gelagerten mittelkeimreifen Gerste Ng_4.

Ebenso wie die Gersten zeigen auch die Weizen, Hafer und Roggen durchwegs das gleiche Bild, nämlich mit fortschreitender Reife eine zunehmende Verringerung der Säure und formoltitrierbaren Körper. Selbst bei den Roggen konnte das gleiche bestätigt werden, obwohl sich diese in mancher Beziehung völlig anders verhielten als Gerste, Weizen und Hafer und deshalb schon zu einer Ausnahme hätten Veranlassung geben können. Während die sowohl nach Alkoholabtötung und auch durch Digestion bei 50° C erhaltenen Maischen der anderen Getreidearten mehr oder minder rasch abliefen, war bei den Roggen nur mit größter Mühe in sehr langer Zeit so viel Filtrat zu erhalten, daß die Analysen ausgeführt werden konnten. Ferner zeigten die Roggen bei Anstellung der Keimversuche einen außerordentlichen starken Befall an Mikroorganismen, z. B. Mucor, Penicillium und besonders Fusarium, die sicherlich auch für die mangelhafte Weiterentwicklung der Roggen während der Lagerung verantwortlich zu machen sind; wie aus Tabelle IV ersichtlich, ist eine zweimonatliche Lagerung spurlos an den Roggen vorübergegangen.

Ein ganz anderes Bild aber liefert uns die Betrachtung der durch Digestion bei 50° gewonnenen Werte. Hier hatten die Enzyme reichlich Gelegenheit, ihre Tätigkeit zu entfalten. Wenn auch die Temperatur von 50° C nach unseren Untersuchungen nicht die günstigste für die Tätigkeit der säurebildenden Enzyme darstellt (53°), so ist sie trotzdem auch nicht allzu weit entfernt von den optimalen Temperaturen anderer pflanzlicher Enzyme. Die proteolytischen Enzyme der Samen entfalten beispielsweise ihre Tätigkeit am besten bei Temperaturen in der Nähe von 46° C, die Phosphatasen etwas höher in der Gegend von 58° C und auch für die Fermente der Kohlehydratgruppe kann 50° noch als günstig bezeichnet werden. Kurz, wir werden bei Innehaltung einer Digestionstemperatur von 50° C einen annehmbaren Durchschnitt der gesamten enzymatischen Leistung voraussetzen dürfen.

Die Betrachtung der auf diese Weise erhaltenen Werte läßt weitgehende Unterschiede einmal in bezug auf die einzelnen Gruppen, ferner mit Rücksicht auf die verschiedenen Arten innerhalb der Gruppen und schließlich in Richtung der Größenordnung dieser Werte erkennen.

Die Gerste Fg_2 läßt auch hier wieder keinerlei Unterschiede von Bedeutung zwischen der Gelbreife, der Vollreife und zweimonatlicher Lage-

Digitized by Google

rung erkennen, ein Befund, der wieder im Einklang damit steht, daß diese Gerste infolge ihrer frühkeimreifen Eigenschaft eben sehr rasch die Vollendung des Reifeprozesses erreicht hat. Ähnliches gilt für die Gerste Ng_4, bei welcher sich die gelbreife Probe durch die vierwöchentliche Lagerung vor der Analyse der vollreifen weitgehend angenähert hatte. Auch die Hadogerste läßt in Übereinstimmung mit oben Gesagtem keine namhaften Unterschiede zwischen Gelb- und Vollreife erkennen. Deutlich treten zum erstenmal bei der Hildegerste Unterschiede zutage. Diese Gerste hat von der Gelbreife zur Vollreife einen wesentlichen Fortschritt gemacht. Auffallenderweise aber nehmen die durch Digestion ermittelten Werte von Säure und formoltitrierbaren Körpern ganz erheblich ab, um erst nach der Lagerung und damit nach Erreichung der vollen Keimreife wieder eine Zunahme zu erfahren.

Die Wintergerste V_6 macht von den übrigen Gersten insofern eine Ausnahme, daß sie von der Gelbreife zur Vollreife eine Zunahme der enzymatisch entstandenen Säure- und Formoltitrationswerte aufweist, um dann während der Nachreife daran zu verarmen und erst nach Erreichung der vollen Keimreife eine Zunahme zu erfahren. Allerdings war die gelbreife Probe etwas früher entnommen worden als die übrigen, so daß dieses Stadium mit dem gelbreifen Stadium der übrigen Gersten nicht ohne Einschränkung verglichen werden darf.

Die 3 Weizen verhalten sich untereinander ähnlich. Mit fortschreitender Reife nehmen die Digestionswerte für Säure und Formoltitration zuerst ab, um dann während der Lagerung wieder zuzunehmen. Die Größe der Zunahme ist bei den einzelnen Varietäten verschieden. Auf eine Merkwürdigkeit der beiden Weizen L und Strubes Kreuzung sei noch hingewiesen, nämlich, daß sie beim Stadium der Gelbreife eine höhere Keimfähigkeit aufweisen als bei dem der Vollreife. Die Erklärung dieser Eigentümlichkeit soll später noch versucht werden.

Die Hafer gleichen teils den Gersten, teils den Weizen. Gotenhafer zeigt zuerst eine Abnahme, dann wieder eine Zunahme der Digestionswerte, während bei den beiden andern (Strubes Hafer und Weihenstephaner Gelbhafer) der Zuwachs ein mit fortschreitender Reife gleichmäßig steigender ist.

Die Roggen weisen eine ganz besonders starke Zunahme an Digestionssäure auf. Sicherlich haben die Enzyme der Bakterien, von welchen, wie erwähnt, beide Roggen stark befallen waren, einen Teil mit zu dieser starken Zunahme beigetragen.

Bei der Kartoffel fallen die hohen Zahlenwerte sowohl für Säure als auch für formoltitrierbare Körper auf. Im Verlauf der Reife nehmen die ursprünglich vorhandenen und die durch Digestion entstandenen Werte erheblich ab.

Zusammenfassend kann man also sagen: Die enzymatischen Verhältnisse während der Reife und der Lagerung bis zur Erreichung der vollen Keimfähigkeit sind je nach Gruppe und Art verschieden. Sie äußern sich entweder in einer fortschreitenden

Digitized by Google

Zunahme oder in einer anfänglichen Abnahme, welche dann während des Nachreifeprozesses einer Zunahme wieder Platz macht.

In letzter Zeit hat ähnlich wie wir und in Gedankenaustausch mit uns A. Reichard[1]) eine größere Reihe von Untersuchungen an Gersten angestellt. Er hatte allerdings die Methode der Analyse, so wie wir sie benützten, für die besonderen Zwecke des Brauereilaboratoriums etwas abgeändert, indem er die Titration auf Phenolphthalein in ein und derselben Probe nach Zugabe von Formalin fortsetzte, ohne also, wie wir, die Phosphate abzuscheiden. In Übereinstimmung mit uns fand auch Reichard durchwegs die Abnahme der ursprünglich vorhandenen Säure und der formoltitrierbaren Substanzen mit fortschreitender Keimreife. Was die Zunahme dieser beiden Gruppen bei der Digestion anbelangt, so findet er eine Zunahme derselben entsprechend der zunehmenden Keimkraft. Allerdings hat er nicht wie wir immer auch das gelbreife Stadium mit in den Kreis seiner Untersuchungen gezogen. Denn sehen wir von diesem Reifestadium ab, so finden wir ja auch immer eine Zunahme der beiden Digestionswerte von der Vollreife und nach der Lagerung, während vor der Vollreife, wie erwähnt, öfters eine bedeutende Abnahme festzustellen war.

Was das Verhältnis der Neutralrotsäure zur gesamten auf Phenolphthalein titrierbaren Säure anbelangt, so ersehen wir aus den Tabellen bei Betrachtung der „Neutralrotprozente", daß im großen ganzen die Neutralrotsäure bei der Abnahme der ursprünglich vorhandenen Säure stärker betroffen wird als die Gesamtsäure. Bei der Digestion nimmt die Neutralrotsäure im großen ganzen etwas zu, jedoch tritt in einigen Fällen auch das Gegenteil ein. Auch die Neutralrotprozente der Digestionssäure erfahren von der Gelbreife zur Vollreife, wenn auch nicht ausnahmslos eine Abnahme.

Endlich sei noch dem Verhältnis von Stadium II zu Stadium I bei der Formoltitration ein Wort gewidmet. Diese Verhältniszahl gibt uns nach Henriques und Soerensen bekanntlich einen Aufschluß darüber, welcher Art die formoltitrierbaren Körper sind. So zeigen die am weitesten abgebauten Spaltprodukte Verhältniszahlen von 4—164, während polypeptidartige Spaltprodukte viel kleinere Zahlenwerte, etwa 2 aufweisen. Ohne diesen Zahlen zuviel Wert beilegen zu wollen, zumal in unserem Fall auch Ammonsalze, die die Stadientitration beeinflussen, zugegen sind, können wir aus diesen Verhältniszahlen folgern, daß wir es mit einem Gemisch von einfachen mit höher molekularen Eiweiß-

[1]) Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen **61**, Nr. 33—37. 1918.

Digitized by Google

produkten in unseren Extrakten zu tun haben, das sich im ganzen ziemlich gleichmäßig konstant erhält.

Bei der Digestion bemerken wir durchwegs eine mehr oder minder erhebliche Vergrößerung dieser Verhältniszahl gegenüber dem entsprechenden Wert der mit Alkohol abgetöteten Probe und glauben daraus auf die Tätigkeit eines mehr tryptischen als peptischen Enzymes schließen zu dürfen.

Einige Versuche verdienen noch der Erwähnung, die wir anstellten, um den Einfluß einer mäßig gesteigerten Temperatur auf den Reifungsprozeß zu prüfen.

Denn entsprechend einem in der letzten Zeit immer mehr zunehmenden Gebrauch wird vielfach das Getreide bei mäßiger Temperatur nach der Ernte vor der Einlagerung getrocknet und man hat damit größtenteils nur gute Erfahrungen gemacht. Wir verfuhren derart, daß wir die betreffenden Proben in einer Menge von etwa 100 g in einem Wassertrockenschrank bei 38—40° C 12—18 Stunden trockneten und nach dem Erkalten sofort die Analyse und die Anstellung einer Keimprobe vornahmen. Bei der Hadogerste wurde neben der eben beschriebenen Art der Trocknung noch eine zweite Probe getrocknet, indem man durch Einschluß der Gerste in ein gut schließendes Pulverglas für Vermeidung von Wasserverlust sorgte. Die Resultate finden sich in Tabelle I unter Hadogerste und Wintergerste V_6 verzeichnet. Erwähnt mag noch werden, daß die Trocknung immer mit der vollreifen Probe, und zwar kurz nach der Probenahme bei Anstellung der Analyse vorgenommen wurde.

Aus den Versuchsergebnissen geht in deutlicher Weise hervor, daß die Trocknung immer größere innere Veränderungen bewirkte, und zwar regelmäßig im Sinne einer Reifungsförderung. Die Keimfähigkeit der Gerste V_6 hatte durch das 12stündige Trocknen von 2% auf 69% zugenommen. Die Abnahme der Werte für ursprünglich vorhandene Säure und formoltitrierbare Körper war eine ähnliche wie die beim Reifungsgang sonst beobachtete. Die enzymatische Tätigkeit hatte abgenommen, so wie es auch anfänglich bei der langsamen Nachreife dieser Gerste der Fall war. Beim Vergleich der analytischen Befunde nach dreiwöchentlicher Lagerung dieser Gerste mit denjenigen nach erfolgter Trocknung, erkennt man, daß die Lagerung von dreiwöchentlicher Dauer und die kurze Trocknung bei 40° das gleiche Ergebnis im Fortschritt des Reifezustandes annäherungsweise etwa hatten. Auf keinen Fall konnte aber durch die Trocknung die volle Keimreife erzielt werden.

Digitized by Google

Die Hadogerste ergab im wesentlichen die gleichen Befunde. Es konnte durch die Trocknung der Reifungsvorgang beschleunigt werden, jedoch nicht in dem Maße wie bei der Gerste V_6. Das hat sicherlich seinen Grund darin, daß diese Gerste in ihrem Reifungsprozeß schon weiter fortgeschritten war als jene. Auch L. Kiessling[1]) erwähnt bei seinen Trocknungsversuchen, daß der Effekt der Trocknung in bezug auf die Verbesserung der Keimfähigkeit wohl von dem Zeitpunkt, wann die Trocknung vorgenommen wird, abhängt, und zwar je frühzeitiger, desto größer ist der Erfolg.

Im Gegensatz zur Gerste V_6 haben bei der Hadogerste die durch Digestion entstandenen Werte nach der Trocknung zugenommen, wodurch diese Gerste im Reifungsverlauf der Hildegerste sich nähert.

Besonders bemerkenswert aber ist noch das Resultat des Versuches, bei dem die Trocknung unter Vermeidung des Wasserverlustes stattgefunden hatte. Wie aus der Tabelle I ersichtlich, hat sich der Wassergehalt nur geringfügig (von 17,27 auf 15,25%) geändert. Trotzdem sind alle analytischen Befunde im wesentlichen die gleichen wie bei gewöhnlicher Trocknung an der Luft unter Wasserverlust Daraus darf wohl mit Sicherheit der Schluß gezogen werden, daß nicht, wie so oft vermutet, allein der Verlust an Wasser es ist, der im Sinne der Reifungsförderung wirkt, sondern daß, wie später noch erörtert werden soll, der stattgehabte Wärmereiz dafür die Ursache war. Übrigens decken sich unsere Ergebnisse mit denen Kiesslings (l. c.), der auf Grund einer großen Zahl von Versuchen ebenfalls einwandfrei den Beweis erbracht hatte, daß nicht der Wasserverlust, sondern der Wärmereiz für die Zunahme der Keimfähigkeit beim Trocknen die Ursache ist.

Endlich sei noch eines letzten Versuches Erwähnung getan, den wir anstellten, um mit unseren erwähnten Methoden einen Einblick in den physiologisch entgegengesetzten Prozeß der Reifung, die Keimung, zu erhalten. Eine Probe der gelagerten Hildegerste wurde 40 Stunden geweicht und dann unter gelegentlichem Besprengen 4 Tage keimen gelassen. Nach 12stündigem Trocknen bei 50—53° C wurde die Analyse vorgenommen. Man sieht aus den Untersuchungsergebnissen, wie stark die ursprüng-

[1]) Landwirtschaftl. Jahrbuch f. Bayern 1911, Nr. 6.

Digitized by Google

lich vorhandene Säure und besonders die formoltitrierbaren Substanzen gegenüber der 2 Monate gelagerten Probe zugenommen haben. Auch die Digestionssäure hat, wie ja nicht anders zu erwarten war, und zwar auch wieder besonders, was die proteolytischen Spaltungen anbelangt, eine erhebliche Zunahme erfahren. Wie aus den Verhältniszahlen zu ersehen ist, sind besonders die tryptischen Spaltungen gegenüber den peptischen in den Vordergrund getreten. Wenn man die einzelnen Stadien der Reife mit diesem Stadium der Keimung vergleicht, findet man in grober Annäherung für das Stadium der Gelbreife und dieses Keimungsstadium Werte gleicher Größenordnung. Es kann uns also dieser Keimungsversuch ein beiläufiger Maßstab sein, um uns über die Größenordnung der bei der Reife sich abspielenden Prozesse ein Bild zu machen. Wir können sagen, daß was in viertägiger Keimung an Abbau geleistet wurde, das Korn von der Gelbreife zur Vollreife und während zweimonatiger Lagerung im Aufbau zustande brachte. Wir sind natürlich weit entfernt, die entgegengesetzt verlaufenden Prozesse der Reifung und Keimung als spiegelbildlich umkehrbare Prozesse zu betrachten, denn dazu sind die inneren chemischen Veränderungen, wie sie sich beispielsweise nur aus den Werten der Neutralrot-Prozente und der Verhältniszahlen bei der Formoltitration äußern, denn doch zu große.

Anschließend an unsere Versuchsergebnisse sei nun im folgenden der Reifungsvorgang selbst ganz allgemein in chemischer und biochemischer Hinsicht etwas näher betrachtet. Wie eingangs erwähnt, sind unsere Kenntnisse über die chemischen Umwandlungen während der Reife noch keine allzu großen, sie wurden erst in jüngster Zeit durch einige umfassende Arbeiten auf dem Gebiet der Proteine und Kohlehydrate erweitert. Die meisten Arbeiten erstreckten sich auf die Untersuchung sehr weit auseinander liegender Zeitpunkte in der Reife, während deren noch ganz beträchtliche Zunahmen an Korngewicht zu verzeichnen sind, hingegen, wie angeführt, bei unseren Versuchen diese Zunahme von ganz untergeordneter Bedeutung war. Im wesentlichen liegen nun folgende, die einzelnen Körpergruppen betreffenden Untersuchungen vor[1]).

[1]) Größtenteils zusammengestellt nach **Czapek**, Biochemie der Pflanzen, I. u. II.

Digitized by Google

Schulze und Frankfurt[1]) fanden, daß der Lecithingehalt bei fortschreitender Reife eine Zunahme erfährt: In unreifen Gersten beispielsweise fanden sie 0,5%, in den reifen 1,23% Lecithin, das sich während der Keimung sogar noch vermehrte.

Eine allerdings ältere Beobachtung von Lindenmeyer[2]) bestätigt auch für das Phytosterin den gleichen Befund, nämlich, daß es während der Reifung eine Zunahme erfährt. Schulze und seine Mitarbeiter konnten eine weitere Zunahme auch während der Keimung feststellen.

Aus der Gruppe der Kohlenhydrate liegen einige ältere Beobachtungen von Portele[3]) vor, der fand, daß der Rohrzuckergehalt in reifenden Samen dauernd abnimmt:

Im Zustand als die Körner gelb und hart wurden, enthielten sie	5,827%	R.-Z.
im Zeitpunkt des Entfahnens	2,451%	„
in der Vollreife	0,035%	„

Nach Muntz[4]) kommt vor der Reife auch Lävulin und Synantrose vor, während der Reife verschwinden sie und werden durch Stärke vertreten.

Jessen-Hansen[5]) fand in unreifem Roggen wenigstens fünf verschiedene Kohlenhydrate: Glykose, Fructose, Saccharose, Secalose und ein linksdrehendes amorphes Kohlenhydrat, das Apopeponin.

Neuere, eingehende Arbeiten über die Veränderungen der Kohlenhydrate während der Reife stammen von André[6]), der unter anderem zu dem Schlusse kam, daß der Zustand der Vollreife dann erreicht sei, wenn die Umwandlung der löslichen Kohlenhydrate in unlösliche aufgehört oder ihr Maximum erreicht habe.

Die Säureabnahme während der Reife ist hauptsächlich am Obst viel studiert worden. Auch über die Veränderungen im Aschegehalt liegen eine Reihe von Angaben vor.

Nach Portele (loc. cit.), Arendt[7]) und Norton[8]) nimmt die Asche während der Reife dauernd ab. So fand Portele im Maisfruchtknoten:

unmittelbar nach der Blüte	5,45%	Asche
als die Körner nicht mehr leicht zerdrückbar waren . . .	4,82%	„
als die Körner hart und gelb waren	2,81%	„
zur Zeit des Entfahnens (11. IX.)	1,95%	„
am 3. X.	1,44%	„
„ 11. X. Ernte	1,75%	„

[1]) Landwirtschaftl. Versuchsstation **43**, 307. 1894.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **1**, 82. 1877.

[3]) Landwirtsch. Versuchsstat. **32**, 241. 1885.

[4]) Compt. rend. **87**, 6. 1879.

[5]) Carlsbg. Lab. Meddel. **4**, 145. 1897.

[6]) Compt. rend. 1902: 134, 995; 1904: 138, 1516, 1712; 1904: 139, 805; 1905: 140, 1417.

[7]) Landwirtsch. Versuchsstat. **1**. 1866.

[8]) Zit. bei Wolf, Ascheanalysen **1**, 27.

Digitized by Google

Arendt fand für Avena sativa

am 30. VI.	3,89%	Asche
„ 10. VII.	3,67%	„
„ 21. VII.	2,82%	„
„ 31. VII.	2,68%	„

Norton fand

am 2. VII.	4,91%	„
„ 9. VII.	4,36%	„
„ 10. VII.	3,38%	„

Als Mittelzahlen für Phaseolus vulgaris fand Norton

im unreifen Zustand	4,65%	Asche
im reifen Zustand	3,22%	„

Für Aesculus hypocastanum:

unreif	3,70%	Asche
reif	1,96%	„

Bei der Asche allerdings ist die Abnahme sehr oft nur eine scheinbare, dadurch bedingt, daß die organischen Kornsubstanzen (Stärke, Protein usw.) viel mehr noch zunehmen, als die Asche, welche bereits sehr frühzeitig aufgenommen wird. Die Aufnahme der einzelnen Aschenbestandteile erfolgt mit verschiedener Intensität, besonders erreicht die Aufnahme des Kalis schon sehr frühzeitig ein Maximum.

Nach Iwanoff[1]) können in heranwachsenden Kotyledonen von Amygdalus, Prunus, Pisum anfänglich durch mikrochemische Reaktionen reichlich anorganische Phosphate nachgewiesen werden, die dann mit fortschreitender Reife verschwinden.

Was die Gruppe der stickstoffhaltigen Substanzen anbelangt, fand Schulze[2]) in unreifen Samen größere Mengen von Aminosäuren, in reifen Samen dagegen bedeutend weniger, z. B. für Lupinus luteus

	am 22. VII.	12. VIII.	19. VIII.	26. VIII.	13. IX.
Amidstickstoff	1,36	0,316	0,306	0,364	0,123

Nach Emmerling[3]) enthält Vicia Faba

am 28. VII.	Amidstickstoff	0,844%
„ 18. VIII.	„	0,342%
„ 1. IX.	„	0,142%
„ 9. X.	„	0,045%

[1]) Jahrb. f. wissensch. Botanik **36**, 377. 1901.

[2]) Landwirtsch. Jahrbücher **59**, 1; 1880 und Zeitschr. f. physiol. Chemie **65**, 431; 1910.

[3]) Landwirtsch. Versuchsstat. **34**, 1. 1887.

Digitized by Google

Nach Nedokutschajeff[1]) nimmt der Nichtproteinstickstoff besonders darunter das Asparagin während der Reife ab. Albumosen und Peptone fand er in allen Reifestadien vorhanden.

Zalesky[2]) konnte den Beweis erbringen, daß die nach Emmerling in den Blättern gebildeten Aminoverbindungen in den Vegetationspunkten, wie Früchten und Samen zu Protein aufgebaut werden, indem er unreife Samen von Pisum sativum halbierte, die eine Hälfte sofort analysierte und die zweite Hälfte nach dreitägiger Aufbewahrung an feuchter Luft. Er fand in der zweiten Probe eine Zunahme des Proteins und eine Abnahme der übrigen Stickstoffverbindungen.

Eine erschöpfende Arbeit aus neuster Zeit über die Veränderungen der Stickstoffsubstanzen während der Reife der Gerste stammt von H. Schjerning[3]). Die wichtigsten Ergebnisse, die für uns hier besonders in Betracht kommen, sind folgende: Bis zur Gelbreife erstreckt sich das Entwicklungsstadium, von der Gelbreife an beginnt das Reifestadium, Bei einem normalen, nicht zu langen noch zu kurzen Entwicklungsverlauf nehmen von der Gelbreife zur Vollreife die tryptischen, peptischen und löslichen Stickstoffverbindungen ab, die unlöslichen dagegen zu. Das Stadium der Vollreife ist nach Schjerning dann erreicht, wenn die Umwandlung der löslichen Stickstoffverbindungen in unlösliche aufgehört oder ein Maximum erreicht hat. Das gleiche gilt auch quantitativ bezüglich des Gesamtgehaltes an Asche und freier Säure nur mit dem Unterschied, daß uns über die Beziehungen zwischen löslichen und unlöslichen Gruppen oder Einzelkörpern dieser Substanzklassen nichts bekannt ist. Ferner konnte Schjerning aus seinen Versuchen folgern, daß, wenn die Entwicklungsperiode des Kornes von kurzer Dauer war, der Zahlenwert für den Prozeß des Eiweißaufbaues stets höher ist, als der für die Stickstoffzufuhr, während es gerade umgekehrt ist, wenn die Periode lange dauert. In einer Periode von normaler Dauer haben dagegen die beiden Prozesse fast gleiche Zahlenwerte. Mit anderen Worten, wenn die Entwicklung des Kornes von der Grünreife zur Gelbreife in einer normalen Zeitdauer stattfindet, dann besteht ein Gleichgewichtszustand zwischen der in einer bestimmten Zeit zugeführten und der in der gleichen Zeit in unlösliche Proteinsubstanzen übergeführten Stickstoffmenge. So geht also Entwicklung und Reife Hand in Hand. In einer Periode von kurzer Entwicklungsdauer aber geht der Aufbau von löslichen Stickstoffsubstanzen in unlösliche mit größerer Schnelligkeit vor sich als die Stickstoffzufuhr zum Korn, das heißt die Reife fängt schon bald an den Entwicklungsprozeß zu überwiegen. Bei einer langen Entwicklungsperiode endlich überwiegt die Aufnahme des Stickstoffes über den Aufbau, oder die Reifung findet außerordentlich langsam statt. Auch findet während einer langen Entwicklungsdauer der tryptische Aufbau in schwächerem Maße statt als bei einer kurzen

[1]) Landwirtsch. Versuchsstat. **56**, 303.

[2]) Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **23**, 125. 1905.

[3]) Compt. rend. d. trav. d. Labor. d. Carlsbg. **11**, H. 2. 1914. Deutsch referiert in Allg. Brauer- u. Hopfenzeitung 1917, S. 913.

Digitized by Google

Entwicklungsperiode. Klimatische Verhältnisse üben einen merklichen Einfluß auf den Stickstoffaufbau und den Verlauf der Entwicklung und Reifung aus. Ein warmer und trockener Sommer gibt im allgemeinen einen vollkommeneren Stickstoffaufbau als ein kalter und nasser Sommer. Normale Entwicklung vorausgesetzt, findet man kurz vor der Gelbreife das Maximum der aufbauenden Prozesse im Korn. Der Übergang zwischen Entwicklungs- und Reifungsperiode ist also bei der Gelbreife ein deutlicher, bei sehr langer Vegetationszeit verschwindet er. Überreife am Halm äußert sich durch den entgegengesetzten Verlauf der Reifung, es kommt wieder zu einem Abbau, zu einer Zerstörung des aufgebauten Materials. Während der Reife ist der Proteinaufbau größer als der Albuminaufbau, während bei der Entwicklungsperiode das Umgekehrte der Fall ist. Während der Lagerung ergeben sich nach Schjernings Befunden nur mehr geringfügige Änderungen. Die gelbreifen Proben verändern sich während der Lagerung im Sinne der Nachreife, also der gleiche Befund, den wir auch bei Gerste Ng_4 beobachten konnten. Die vollreifen, normal geernteten Proben zeigen die geringsten Änderungen, lediglich das Albumin I wird zu Albumin II kondensiert und eine Kleinigkeit nehmen die tryptischen Abbauprodukte ab, wie dies unzweifelhaft aus den Tabellen Schjernings herauszulesen ist.

Aus der großen Mehrzahl der angeführten Beobachtungen älterer und neuerer Forscher geht deutlich hervor, daß bei der Reifung ein allgemeiner Aufbau und eine fortschreitende Kondensation einfacherer Körperklassen zu komplizierter zusammengesetzten stattfindet. Je nachdem dieser Aufbau zu einer gewissen Vollendung gelangt ist, werden die Prozesse noch während der Lagerung und der Nachreife einem gewissen Gleichgewichtszustand zustreben, der bei der vollen Keimreife erreicht zu sein scheint.

So können wir denn in Übereinstimmung mit den übrigen Forschern aus unseren Versuchen den Schluß ziehen, daß während der späteren Reife und Nachreifestadien eine Kondensation von formoltitrierbaren Aminogruppen einfacherer Stickstoffsubstanzen zu höheren stattfindet. Ob nun diese Kondensation dadurch zustande kommt, daß niedrig molekulare Spaltprodukte, die sich bisher der Kondensation entzogen haben, zu hochmolekularen aufgebaut werden, oder aber, ob z. B. das Albumin I, ein Eiweißkörper mit verhältnismäßig noch mehr freien Amino- und Carboxylgruppen, zu Albumin II, das davon infolge seines höher kondensierten Zustandes weniger enthält, aufgebaut wird, läßt sich aus unseren Versuchen ohne weiteres nicht feststellen. Für letztere Betrachtungen spricht das Resultat der Studien Schjer-

Digitized by Google

nings, besonders so weit es die Lagerung anbelangt, für erstere Anschauung die Befunde Schulzes, Nedokutschajeffs, Zaleskys (l. c.), wonach im reifenden Samen Amidoverbindungen abnehmen und Proteine an ihre Stelle treten. Auch die oftmals bemerkte Tatsache, daß Samen im gelbreifen Zustande eine bessere Keimfähigkeit aufweisen als im vollreifen (siehe die Weizen!), könnte für erstere Anschauung beweisen. Der Grund dafür kann meines Erachtens darin gefunden werden, daß eben von den niedrigen Eiweißbausteinen, den Aminosäuren und ihnen nahestehenden stickstoffhaltigen Körpern, noch so viel im Korn vorhanden ist, daß der Keimling, der bereits ein gewisses Stadium seiner Funktionstüchtigkeit erreicht hat, so viel leicht diffundierbare Nahrung antrifft, daß er sein Wachstum und seine Entwicklung beginnt. Man findet allerdings auch oft bei derartigen Keimversuchen, daß nach anfänglich rascher Entwicklung das Gewächs abstirbt, was dadurch zu erklären wäre, daß mit der Erschöpfung der leicht assimilierbaren Nahrung durch den Keimling, das Leben zum Stillstand kommt, weil eben der Keimling doch noch nicht die zur Sekretion der Enzyme erforderliche Vollendung erreicht hat. Auch die Erscheinung des Auswuchses am Halm mag zum Teil auf ähnliche Bedingungen mit zurückzuführen sein.

Ohne uns also ausschließlich auf die eine oder andere der beiden geäußerten Anschauungen festlegen zu wollen, können wir zusammenfassend behaupten, daß während der späteren Reife und der Lagerung ein immer langsamer werdender Aufbau und Kondensationsprozeß einfacher und niedriger Stickstoffverbindungen in höhere und kompliziertere stattfindet.

Nun zu den Veränderungen in der Säuregruppe während der Reife. Die Ansichten über die Veränderungen der Säure während der Reife sind sehr verschieden, entsprechend den verschiedenen Ansichten über Entstehung und Rolle der Säure selbst.

Nach Liebig[1]) stellt die Säure eine Zwischenstufe zur Zuckerbildung dar; Holzner führt als Stütze dieser Theorie das Verschwinden von Säure und das Auftreten von Zucker in Früchten an. An Stelle dieser längst verlassenen Theorie ist die Anschauung getreten, daß die Säuren als Oxydationsprodukte der Zucker aufzufassen seien. Die Beobachtungen von C. Kraus über nächtliche Säurebildung in Succulenten und die anderer

[1]) Czapek, Biochemie, Pflanzen.

Digitized by Google

Forscher, wonach junge Blätter saurer sind als alte, und lebhaft wachsende Organe am meisten Säure aufweisen, stützen diese Anschauung. Nach Mayer[1]) sind die Säuren Zwischenprodukte der Atmung. Puriewitsch[2]) sieht in den Säuren unvollständige Oxydationsprodukte der Kohlehydrate. Die Abnahme der Säure während der Reifung sah man als eine Folge des Abfalles der Atmungsintensität an, die mit Beendigung des Entwicklungsganges des betreffenden Organes eintritt. Die Ansicht, daß die Abnahme der Säure durch Übergang in Kohlehydrate zu erklären sei, wurde bereits von Pasteur widerlegt, indem er fand, daß Säureabnahme und Anreicherung von Zucker durchaus nicht parallel zu gehen brauchen. Daß auch kein Neutralisationsprozeß bei der Säureabnahme eine Rolle spielt, ist von Mach[3]), Portele (l. c.) und Biedermann[4]) dadurch bewiesen worden, daß Abstellung der Mineralzufuhr die Säureabnahme nicht verhindert. Dragendorff[5]) und Saint-Pierre und Magnien[6]) geben der Atmung die Schuld für das Verschwinden der Säure. Auch an eine Entcarboxylierung der Aminosäuren könnte man gelegentlich der Säureabnahme denken[7]).

Es muß zugegeben werden, daß sicher die eine oder andere Deutungsweise auch für unseren Fall zutreffen wird. Besonders wird daran zu denken sein, daß durch Veratmung von organischen Säuren eine Energiequelle aufgeschlossen wird, die endotherme Prozesse, wie Kondensationen und Aufbau, ermöglicht. Wenn wir uns jedoch ein Bild von der Zusammensetzung der Säuren in den Cerealien machen, müssen wir zugeben, daß der größte Teil obiger Erklärungsversuche, die wohl für die süßen Früchte gelten mögen, für unsere Verhältnisse nicht in Betracht kommt. Den Hauptanteil der Säure in unserem Fall machen nämlich die Phosphate aus, und die Veränderungen der Phosphate werden es in erster Linie sein, welche den Säureabfall während der von uns untersuchten Reifestadien bedingen.

Wie oben erwähnt, fand Iwanoff durch mikrochemische Reaktionen in den Kotyledonen von Amygdalus, Prunus und Pisum reichlich anorganische Phosphate während des Heranwachsens, die später dann verschwinden. Eine allgemein bekannte Tatsache ist auch die, daß in reifen Samen die gesamte

---

[1]) Landwirtsch. Versuchsstat. **34**, 127. 1887.

[2]) Bot. Centralbl. **58**, 338. 1894.

[3]) Annal. Önolog. **6**, 409. 1877.

[4]) Centralbl. f. Agrik.-Chemie 1879, S. 758.

[5]) Just. bot. Jahresber. **1**, 597. 1878.

[6]) Comp. rend. **86**, 49. 1878.

[7]) Vgl. auch Jenny Hempel, Buffer processes in the metabolism of Succulent plants. Compt. rend. des trav. d. Labor. d. Carlsbg. **13**, 11. 1917.

Digitized by Google

Phosphorsäure zum weitaus überwiegenden Teil in organischer Bindung vorhanden ist und die anorganische Phosphorsäure oft nicht einmal 10% der Gesamtphosphorsäure ausmacht. Es muß also zu einem Aufbau von organischen Phosphaten während der Reife aus mineralischer Phosphorsäure gekommen sein. Leider war es uns mangels an Zeit nicht möglich, diese interessanten Verhältnisse eingehend zu verfolgen; lediglich zur Orientierung unternahmen wir einen Versuch an Hildegerste, indem wir im gelbreifen und zwei Monate gelagertem Stadium die Menge der „löslichen" Phosphorsäure durch Veraschen der nach Alkoholtötung gewonnenen Extrakte ermittelten. Es wurde gefunden:

	gelbreif	nach zweimonat. Lagerung
P_2O_5	0,341 g d. Trock.-S.	0,292 g d. Trock.-S.

Daraus erkennt man, daß die Menge der löslichen Phosphorsäure, welche nach L. Adler[1]) fast nur aus anorganischen Phosphaten besteht, von der gelben zur vollendeten Reife abnimmt, entsprechend wie wir es bei unseren Titrationsversuchen immer auch fanden. Damit wäre auch vereinbar, daß bei der Abnahme der Säure die Neutralrotsäure stärker betroffen wird, indem sich diese Säure ja vorwiegend aus den Phosphaten zusammensetzt, während die Phenolphthaleinsäure die anderen schwachen Säuren, wie Aminosäuren und Eiweißkörper, auch mit einbegreift. Bei der Digestion finden wir das Gegenteil: die Abnahme der organischen und die Zunahme der anorganischen Phosphate, wie wir auch gelegentlich unserer früheren Arbeit auf physikalisch-chemischem Wege mit Hilfe von Leitfähigkeits-Titrationskurven feststellen konnten.

Für den Aufbau der anorganischen Phosphorsäure zu organischer kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht. Einerseits erfährt, wie Schulze (l. c.) zeigte, das Lecithin während der ganzen Dauer des Reifungsprozesses eine Zunahme. Andererseits kann auch die Synthese der Nucleoproteide, Nucleine und Phytovitelline noch einer Steigerung während der Nachreife fähig sein und schließlich gilt das gleiche wohl auch für die Synthese der Kohlehydratphosphate, besonders für das Phytin. Nicht zu vergessen sei auch die Möglichkeit einer Fixierung von anorganischen Phos-

[1]) Dissertation, München 1912, siehe auch Schulze-Castoro, Zeitschr. f. physiol. Chemie.

Digitized by Google

phatresten an die Eiweißkörper, besonders wenn sie, wie das bei der Reife sicher der Fall ist, physikalisch-chemische Zustandsänderungen erleiden, worauf wir später noch eingehender zurückkommen. Auch an eine Bindung anorganischer Phosphate an den Amylosekomplex ist zu denken. Welche dieser Möglichkeiten beim Reifeprozeß, wie wir ihn verfolgten, in den Vordergrund tritt und den Hauptanteil ausmacht, muß vorläufig noch dahingestellt bleiben. Das eine kann als feststehend angenommen werden, daß mit fortschreitender Reife bis zur Erreichung eines Dauerzustandes eine fortschreitende langsame Abnahme der anorganischen Phosphationen stattfindet.

Alle diese verschiedenen Aufbau- und Kondensationsprozesse können eine befriedigende Lösung nur durch die Annahme finden, daß an ihrem Zustandekommen Enzyme mit beteiligt sind, wenn auch, wie später erläutert werden soll, mancher Prozeß im reifenden Korn rein physikalisch-chemischen Gesetzen gehorchen mag. Je nach dem Zustand, in welchem sich das Korn bei oder kurz vor der Ernte im Verhältnis zu dem Dauerzustand, dem es zustrebt, befindet werden auch die enzymatischen Äußerungen verschiedene sein müssen. Da, wo der Gleichgewichtszustand erreicht ist, wo also die Enzyme ihre Tätigkeit verrichtet haben, möchte man annehmen, daß es auch einigermaßen zu einer Konstanz der enzymatischen Kräfte kommen sollte eine Ansicht für welche tatsächlich die Befunde an Gerste Ng_4 und Fg_2 beweisend sprächen. Dort dagegen, wo noch kondensatorische und aufbauende Tätigkeit zu leisten wäre, könnte wohl eine Steigerung der Enzymkräfte denkbar sein. Schwer zu erklären allerdings sind die Fälle, bei denen gerade zu der Zeit, zu welcher noch ein merklicher Aufbau festzustellen ist, eine mitunter recht beträchtliche Abnahme der Enzymtätigkeit stattfindet, die dann später bei der Nachreife und Lagerung wieder einer erheblichen Zunahme Platz macht. Wir müssen allerdings immer im Auge behalten, daß wir mit der Digestionsmethode gerade das Gegenteil, nämlich den Abbau anstatt den Aufbau verfolgen und aus der abbauenden Tätigkeit der Enzyme ganz allgemein Schlüsse auf die enzymatischen Verhältnisse im Korn ziehen. Wenn man jedoch der Erfolge gedenkt, welche in der jüngsten Zeit die enzymatische Synthese auf dem Gebiete der Fette, Kohlehydrate, Glykoside und anscheinend auch auf dem der Eiweißkörper gemacht hat, kann man wohl an einer aufbauenden Wirkung der Enzyme nicht mehr zweifeln. Vom Gesichtspunkt einer Regulierung von Auf- und Abbau im Organismus ist die Umkehrbarkeit der Enzymwirkung wie auch Hofmeister[1]) eingehend dartut, vollends zu fordern.

Was wir bei unseren Digestionsversuchen in vitro bei Gegenwart großer Mengen Wassers, also bei starker Verdünnung von

[1]) Die chemische Organisation der Zelle. Vortrag, Vieweg. Braunschweig 1901.

Digitized by Google

Enzym und Substrat und einer optimalen Temperatur in Form des Abbaues verfolgen können, das kann im Korn sehr wohl bei der hohen Konzentration des reagierenden Substrates als Aufbau sich äußern.

Es bleibt jedoch immer noch die Frage zu erörtern, warum die Enzymkräfte in dem ersten Stadium der Reife, das wir untersuchten, eine solch beträchtliche Abnahme mitunter erfahren. Nicht nur von uns wurde diese Tatsache beobachtet, sondern auch Kiessling (l. c.) erwähnt beispielsweise, daß kurz nach der Ernte die diastatische Kraft abnimmt, um dann wieder langsam zuzunehmen und einigermaßen konstant zu bleiben. Albo[1]) fand zwischen Keimfähigkeit und diastatischer Kraft weitgehende Analognie, allerdings untersuchte er die Proben jeweils nur nach Erreichung einer hohen Keimfähigkeit, sonst wäre ihm sicherlich auch die merkwürdige Abnahme der enzymatischen Kräfte in früheren Stadien, trotz der zunehmenden Keimreife aufgefallen. W. Windisch[2]) fand auch in zahlreichen Fällen einen Parallelismus zwischen Keimfähigkeit und diastatischer Kraft, jedoch in mehreren Fällen auch das Gegenteil.

Es gibt nun mehrere Möglichkeiten, sich diese vorübergehende Abnahme der enzymatischen Kräfte gegen die Vollreife zu erklären. Einmal könnte man annehmen, daß mit dem Aufhören der Zufuhr an Nährstoffen nach dem Korn, das bisher bestehende Gleichgewicht zwischen Zufuhr und Aufbau gestört wurde und durch diese Störung als Reizwirkung der Organismus durch Verminderung oder Schwächung der Enzymkräfte antwortet. Oder es ließe sich geltend machen, daß eine Anzahl von Enzymen, da ihre Aufgabe erfüllt ist, zum Verschwinden gebracht wird. Allerdings müßte man dann annehmen, daß später im weiteren Verlauf der Nachreife neue, den kommenden Verhältnissen der Keimung besser angepaßte, entstehen würden. Dieser Erklärungsmöglichkeit würde die Annahme der Umkehrbarkeit der Enzymtätigkeit widersprechen, andererseits ließe sich letztere Ansicht damit teilweise in Einklang bringen, daß die Natur der Enzyme in verschiedenen Stadien der Kornentwicklung nicht die gleiche ist. So fanden Lintner und Eckhardt[3]), daß die Diastase

[1]) Arch. des sciences phys. et nat. **25**, 45. 1908.

[2]) Wochenschr. f. Brauerei **40**, 356. 1905.

[3]) Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen **11**, 497. 1889 und Journ. f. prakt. Chemie **41**, 91. 1890.

Digitized by Google

des ruhenden Kornes sehr verschieden ist von der des keimenden Korns, indem erstere beispielsweise im Gegensatz zur letzteren fast keine Stärke verflüssigende Tätigkeit aufweist.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit liegt in der Annahme einer Zymogenbildung: Die während der Entwicklungsperiode in reger aktiver Tätigkeit befindlichen Enzyme werden beim Nachlassen vielleicht unter Vermittlung einer Reizwirkung in den Zymogenzustand übergeführt. A. Reichard (l. c.) z. B. vertritt diese Anschauung und faßt den Übergang in den Zymogenzustand als eine Schutzmaßregel des Organismus gegen äußere Einflüsse auf. Die Enzymkräfte sind gewissermaßen latent und schlummernd geworden und es bedarf erst tieferer Eingriffe, wie sie z. B. beim Einleiten der Keimung erforderlich sind, um die Zymogene in die aktiven Enzyme überzuführen. Je nach der Geschwindigkeit, mit welcher die Zymogene aktiviert werden, würde man in der gleichen Versuchsdauer verschiedene Resultate erhalten, ähnlich wie zwei Proben gleicher Keimfähigkeit ganz verschieden in der Keimungsenergie beschaffen sein können, indem die eine Probe beispielsweise doppelt so lange braucht, um die Hälfte der vollen Keimfähigkeit zu erreichen als die andere, während sie die volle Keimfähigkeit in der gleichen Zeit erreichen. Durch Annahme einer teilweisen Zymogenisierung von Enzymen hätte allerdings der Organismus ein feines, regulatorisches Mittel in der Hand, ein zu frühzeitiges Keimen, wenn äußere Bedingungen es sonst gestatten würden, hintanzuhalten, bevor nicht die Umwandlungsprozesse das Korn zur Keimung und Entwicklung der neuen Pflanze befähigt haben.

Es mag erwähnt sein, daß Zymogene in Pflanzen tatsächlich gefunden wurden (Duclaux, Vines, S. Frankfurt). Lintner und Eckhardt[1]) fanden z. B., daß das Mucedin (Gliadin) des Weizens ein solches Proferment darstellt und durch Einwirkung verdünnter Säuren in den aktiven Zustand übergeführt werden kann. — Dieser Zymogentheorie, so gut sich mit ihrer Hilfe die beobachtete Abnahme in den enzymatischen Kräften erklären läßt, steht die Tatsache entgegen, daß es bisher nicht gelungen ist, den Übergang eines Fermentes in den Zymogenzustand nachzuweisen, während der umgekehrte Fall ja allgemein bekannt ist.

[1]) A. Reychler, Ber. d. d. chem. Ges. 1889, S. 414 und Lintner und Eckhardt, Studien über Diastase l. c.

Digitized by Google

Ohne uns auf die Zymogentheorie festlegen zu wollen, möchten wir auch kurz der Verhältnisse, wie wir sie bei den Fermenten und Co-Fermenten antreffen, Erwähnung tun. Angenommen, es käme eine Fermentwirkung in unserem Falle tatsächlich derart zustande, daß ein Co-Ferment, wie etwa anorganische Phosphate oder sonstige Aschenbestandteile, z. B. Mangansalze, mit daran beteiligt ist, so ist leicht einzusehen, daß es mit dem Übergang dieser anorganischen Salze in organische Bindung oder auch nur durch ihre Adsorption an organische Komplexe zu einer Schwächung der Enzymwirkung kommen kann, und daß umgekehrt durch Spaltung der chemischen oder physikalischen Bindung, z. B. während der Keimung, das Gegenteil, eine Verstärkung, eintreten kann. Möglicherweise spielen hier Aschenbestandteile eine Rolle, welche meist der Analyse entgehen, z. B. Mangansalze, die man in der Gesamtasche oftmals vermißt, dagegen in der Asche einiger isolierter Substanzen regelmäßig antrifft. So konnten wir in einem Gerstenphosphatid einwandfrei Mangan nachweisen. Daß Mangansalze als Aktivatoren auftreten können, hat Bredig an der Oxydase gezeigt. Nach Bertrand, ferner Michels und de Heen[1]) üben Mangansalze auch auf die Keimung eine beschleunigende Wirkung aus.

Die langsame Zunahme der enzymatischen Kräfte gegen Ende des Reifungsprozesses, oder während des ganzen Verlaufes der Reifung, wie wir an den Hafern, Roggen und einigen Gersten beobachten konnten, kann auch auf verschiedene Weise gedeutet werden. Sehr viel für sich hat die Annahme, daß durch die langsame Einwirkung äußerer Einflüsse eine allmähliche Aktivierung der Enzyme zustande kommt. Ich denke hier besonders an die Einwirkung des Sauerstoffs, der eine wichtige Rolle in dieser Beziehung zu spielen scheint

So fand bereits Mulder[2]) daß Eiweißkörper, nachdem einige Zeit Sauerstoff auf sie eingewirkt hatte, die Fähigkeit erhielten, Stärkekörner aufzulösen. Baranetzky[3]) wies die Notwendigkeit des Vorhandenseins von freiem Sauerstoff zur Bildung von Diastase nach. Worthmann fand bei Bakterien, daß sie ohne Gegenwart von freiem Sauerstoff keine

[1]) Compt. rend. 1905, S. 141 und Bull. de l'acad. de Belg. Classe des sciences 1906, S. 288.

[2]) Chemie des Bieres, S. 87.

[3]) Die stärkeumbildenden Fermente in den Pflanzen 1878 S. 50—66.

Digitized by Google

Diastase bilden. Ebenso fand Detmer[1]), daß die Diastasebildung von der Gegenwart freien Sauerstoffs abhängig sei und daß im Endosperm von Mais die Lösung der Stärke von der Peripherie an beginnt. Puriewitsch[2]) konnte bei seinen Versuchen, Endosperme nach Abtrennung des Keimlings zur Entleerung zu bringen, feststellen, daß nur bei Sauerstoffgegenwart diese Entleerung vor sich geht. Endlich findet nach J. Grüss[3]) an allen Stellen, wo die Epidermis verletzt ist, auch eine stärkere Enzymproduktion statt. Auch konnte er ähnlich wie Detmer bestätigen, daß die Fermentsynthese von außen nach innen fortschreitet. Bei Phaseolus konnte Grüss überall da, wo die Samenschale der Epidermis der Kothyledonen weniger fest anliegt, einen stärkeren Enzymreichtum feststellen als an jenen Stellen, wo der Kontakt ein inniger war. Schließlich konnte er auch in der Umgebung der Intercellularräume, die mit Luft gefüllt waren, eine stärkere Enzymreaktion feststellen. Aus all diesen Beobachtungen kann man wohl mit Sicherheit schließen, wie dies auch Lintner[4]) bereits getan hat, daß die Diastase ein Oxydationsprodukt gewisser Eiweißkörper darstellt. Vermutlich wird auch bei der Bildung anderer Enzyme dem Sauerstoff eine wichtige Rolle zufallen. In welcher Weise allerdings der Sauerstoff wirkt, ob z. B. an eine Reaktionskopplung oder ähnliches zu denken ist, muß dahingestellt bleiben. Alle derartigen Reaktionen erfordern zu ihrem Ablauf eine gewisse Zeit, hier um so mehr, wenn man sich das verhältnismäßig träge reagierende, wasserarme Korn vorstellt. Daß dabei ein Reaktionsverlauf zustande kommen kann, der abwechselnd Maxima und Minima aufweist, ist wohl möglich. Es findet sich sogar betreffs der Keimfähigkeit eine Beobachtung von Wehsarg[5]) vor, der zufolge Unkrautsamen ein mehrfaches Auf- und Abwärtssteigen der Keimfähigkeit im Verlaufe der Zeit aufweisen können. Auch viele andere Wachstumsprozesse bei Pflanzen weisen derartige Schwankungen bald rascheren, bald langsameren Wachstumsfortschritts auf. Es seien als Beispiel nur die Befunde Hofmeisters[6]) am Längenwachstum von Spyrogyra princeps angeführt. Auch Wo. Ostwald[7]) fand in seinen „Studien über die zeitlichen Eigenschaften der Entwicklungsvorgänge bei biologischen Prozessen" öfters einen oszillatorischen Verlauf derartiger Entwicklungs- und

[1]) Botan. Ztg. 1883, S. 601.

[2]) Jahrb. f. wissensch. Botanik 1, 31.

[3]) Landwirtsch. Jahrb. 25, 386. 1895.

[4]) Arch. f. d. ges. Physiol. 11.

[5]) Wochenschr. f. Brauerei 1907, S. 256. In seiner jüngsten Veröffentlichung „Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft" H. 294, Parey, Berlin 1918, widmet Wehsarg in dem Abschnitt „Periodizität der Keimreife bzw. der Keimung im Vergleich mit den periodischen Wachstumsvorgängen der Pflanzen", diesen Verhältnissen besondere Aufmerksamkeit.

[6]) Pfeffer, Pflanzenphysiologie.

[7]) Vorträge und Aufsätze über Entwicklungsmechanik von W. Roux 1908.

Digitized by Google

Wachstumserscheinungen. Nach Wo. Ostwald ist ein solcher Wachstumsverlauf sehr oft als ein autokatakinetischer Vorgang zu erklären, derart, daß der betreffende Prozeß sich im Verlaufe der Zeit selbst beschleunigt. Möglicherweise können derartige Verhältnisse auch für unseren Fall der Enzymzunahme geltend gemacht werden.

Die Annahme, daß der Sauerstoff bei der Bildung von Enzymen eine Rolle spielt, hat auch für unsere Trockenversuche eine gewisse Bedeutung. Durch das Trocknen wird ohne Zweifel, wie es unsere Versuche an Hadogerste und Gerste V_6 dargetan haben, ein im Sinne der fortschreitenden Reife verlaufender Prozeß verursacht. Daß nicht bloß der Verlust an Wasser, also das Austrocknen den Erfolg bei der Trocknung bedingt, ist durch unseren Parallelversuch mit Hadogerste und durch eine Reihe von Beobachtungen L. Kiesslings (l. c.) bewiesen. Zur Erklärung der Erscheinungen beim Trocknen kommen meines Erachtens hauptsächlich einige reaktionskinetische Betrachtungen in Frage. Es ist ja allgemein bekannt, daß eine Reihe von Reaktionen, welche bei niedriger Temperatur nur sehr langsam verlaufen, durch Steigerung der Temperatur zu einem raschen Ablauf gebracht werden können, ja sogar eine Umkehrung des Reaktionsverlaufes kann die Folge der Temperaturänderung sein. Für sehr viele Reaktionen bedeutet die Steigerung der Temperatur um 10° eine Erhöhung der Geschwindigkeitskonstante um das Zwei- bis Dreifache. Dabei begünstigt nach van't Hoff steigende Temperatur den Verlauf des unter Wärmeadsorption gebildeten Systems. Die größte Mehrzahl der Kondensations- und Aufbauprozesse sind aber derartige endotherme, unter Wärmeadsorption verlaufende Prozesse, woraus der Einfluß der Wärme in dieser Richtung ohne weiteres ersichtlich ist. — Nicht zu vergessen wäre aber auch, daß die Permeabilität der Zellmembranen sich mit der Temperatur verändert. So fand z. B. P. Becquerel[1]), daß bei erhöhter Temperatur die Samenschale für Sauerstoff durchlässig wird. Nach van Rysselberghe[2]) wird die Geschwindigkeit des Durchtritts gelöster Substanzen durch die Plasmahaut infolge Temperatursteigerung stark begünstigt und ist bei 30° beispielsweise achtmal so groß als bei 0°. Nach Szucz[3]) wird auch durch Wasserstoffsuperoxyd die Permeabilität der

[1]) Nach Wochenschr. f. Brauerei 1907, S. 239 zitiert.

[2]) Bull. de l'acad. roy. de Belg. 1901, S. 173.

[3]) Jahrb. f. wissensch. Botanik 52, 269. 1913.

Digitized by Google

Zellhaut gesteigert. Daß Permeabilitätsänderungen allgemein bei der Reife eine Rolle spielen, zeigt auch die oft in den Mälzereien gemachte Wahrnehmung, wonach eine junge, nicht gelagerte Gerste später ihre volle Weiche erreicht als eine normal gelagerte. Ob nun die Änderung der Plasmahautpermeabilität nach Höber eine passive physikalische oder aber eine aktive physiologische ist, die in Abhängigkeit von der Funktion des Organismus, z. B. hier des Keimlings, steht, kann nicht ohne weiteres entschieden werden. Auf alle Fälle sprechen mehrere Beobachtungen dafür, daß bei Reizwirkungen und damit haben wir es auch im Falle der gesteigerten Temperatur zu tun, die Permeabilität sich ändert. Auch einige Versuche von W. Windisch[1]), wonach der abgetrennte Keimling viel empfindlicher als das Endosperm auf gelindes Trocknen reagiert, können als eine Stütze für die funktionelle Betätigung des Keimlings aufgefaßt werden.

Von rein physikalisch-chemischen Veränderungen während des Trocknens sei nur auf die Veränderung des Aggregatzustandes von Gallerten unter dem Einfluß erhöhter Temperatur hingewiesen, mit der auch wieder die Permeabilitätsänderung in ursächlichen Zusammenhang gebracht werden kann.

Bei Betrachtung der Veränderungen in den enzymatischen Verhältnissen während der Reife des Kornes dürfen wir es nicht unterlassen, auch Einflüssen in physikalisch-chemischer Beziehung Rechnung zu tragen.

Die außerordentliche Empfindlichkeit der Enzyme in ihrer Eigenschaft als kolloide Katalysatoren gegen äußere Einflüsse, wie Änderung der Wasserstoffionenkonzentration, Neutralsalzwirkungen, Veränderung der Oberflächenspannung usw., ist aus zahlreichen Arbeiten der jüngsten Zeit, unter denen nur die von S. P. L. Sörensen und L. Michaelis genannt seien, genügend bekannt, so daß an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen zu werden braucht. Eine Reihe von Ergebnissen dieser Arbeiten werden auch für unseren Fall in Betracht kommen. Es sei hier nur an die Empfindlichkeit einiger Enzyme gegenüber Veränderungen im Elektrolytgehalt gedacht. Der Übergang anorganischer Aschenbestandteile in organische Bindung, die Maskierung der Ionen auch durch Adsorption an Kolloide oder ihre Verankerung an Proteine [Bugarzky und Liebermann[2])] sind alles Fälle, bei denen eingreifende Änderungen im Elektrolytgehalt vor sich gehen und somit im Sinne der Beeinflussung der enzymatischen

[1]) Wochenschr. f. Brauerei **40**, 356. 1905.

[2]) Arch. f. d. ges. Physiol. **82**, 51. 1898.

Digitized by Google

Prozesse eine Rolle spielen werden. Auch an die Möglichkeit einer Adsorption der Fermente an Oberflächen müssen wir denken, die nach Hedin[1]) unter Umständen zu einer Lähmung der Fermentwirkung führen kann, während die Verdrängung des Ferments aus der Oberfläche seine Aktivität wiederherstellt. Gerade Betrachtungen der letzten Art führen zu einem neuen Bereich von Erklärungsmöglichkeiten, der erst in jüngster Zeit von E. Abderhalden[2]) erschlossen wurde. Abderhalden kam auf Grund seiner Forschungen über Fermentwirkungen zu der Erkenntnis, daß außer dem Zustand des Fermentes und seiner leichten Beeinflußbarkeit durch die erwähnten Faktoren ganz besonders auch der Zustand des Substrates[3]) und die Wechselwirkungen zwischen Ferment und Substrat von Bedeutung für den Ablauf eines enzymatischen Prozesses sind. Abderhalden setzt im Gegensatz zur bisher üblichen Annahme einmal das Ferment als die gegebene, unveränderliche Größe an und betrachtet das Substrat als den Urheber der Alterationen. Das Zustandekommen des Optimums einer Fermentwirkung faßt er als Resultierende zweier Kräfte auf: der Diffusion des Substrates nach der Fermentphase und der Adsorption der Spaltungsprodukte durch letztere. Das Nachdiffundieren des Substrates, beziehungsweise seiner Ionen und das Loslösen der Spaltprodukte bzw. ihrer Ionen bestimmen das Optimum des enzymatischen Prozesses. Alle Faktoren, welche den Diffusionsweg günstig beeinflussen, werden im Sinne des Optimums wirken. Als solche Faktoren kommen in Betracht: die Diffusionskonstante, Säure- oder Basendissoziationskonstante des Substrates, Adsorptionsaffinitäten (im Sinne Bayliss'), die Beeinflussung der dispersen Fermentphase durch die Substrationen und noch manche andere, wie Alter und Konzentration der Fermentlösung, Grenzflächenspannung der Ferment- und Substratphase usw. Als ein Beispiel, wie tatsächlich durch eine physikalische Veränderung des Substrates eine Fermentreaktion beeinflußt werden kann, seien die Versuche von Bredig und Teletov[4]) angeführt, wonach die katalytische Zersetzung des Wasserstoffsuperoxydes durch Platin bei Zuckerzusatz eine Verzögerung von 33—53% erfährt, je nachdem das Platin als makroheterogenes (Moor) oder mikroheterogenes System (Sol) vorhanden ist. Hier spielt die Diffusion des Wasserstoffsuperoxyds nach der Platinoberfläche die entscheidende Rolle. Durch den Zuckerzusatz wird die Viscosität des Substrates erhöht und damit die Diffusion erschwert. Nach The Svedberg[5]) ist auch die Amplitude der Brownschen Molekularbewegung bei gegebener Teilchengröße der Zähigkeit des Dispersionsmittels umgekehrt proportional; diese Verhältnisse

[1]) Biochemical Journ. **1**, 484, 1906 und Zeitschr. f. physiol. Chemie **82**, 178. 1913.

[2]) E. Abderhalden und A. Fodor, Fermentforschung **1**, 535, 1915; **2**, 74, 1917.

[3]) Siehe auch W. F. Ringer, Die Bedeutung des Substrates bei der Pepsinwirkung. Kolloid-Zeitschr. **19**, 253. 1916.

[4]) Zeitschr. f. Elektrochemie **12**, 581. 1906.

[5]) Zeitschr. f. Elektrochemie **12**, 853 u. 909. 1906.

Digitized by Google

werden aber bei den Fermenten als kolloiden Systemen auch eine Rolle spielen.

Endlich sei noch im Sinne obiger von Abderhalden vertretenen Ansichten des Einflusses der Oberflächenaktivität auf die Fermentreaktionen gedacht. Aus mehreren Arbeiten, die sich auf diesem Gebiete bewegen, geht hervor, daß die Oberflächenaktivität z. B. der Proteine (nach Botazzi[1]) und Buglia[2]) je nach den äußeren Einflüssen einem starken Wechsel unterworfen ist. Wenn wir ferner mit Hofmeister (l. c.) alle Reaktionen im Protoplasma unter Annahme der netzwabigen Struktur an einer enormen Oberfläche vor sich gehend denken, so leuchtet der große Einfluß, welchen eine Änderung der Oberflächenaktivität und der Oberflächenenergien und der damit einhergehenden Beeinflussung der Adsorption in einer reaktionsbeschleunigenden oder -hemmenden Richtung ausüben muß, ohne weiteres ein.

So glaube ich denn auch, daß es vor allem die letzteren Erscheinungen der Zustandsänderungen des Substrates in erster Linie und in zweiter Linie der Fermente sind, welche vor allem zu einer natürlichen und zwanglosen Erklärung der von uns und anderen beobachteten Abnahme und späteren Zunahme der enzymatischen Kräfte im Verlauf der Reife heranzuziehen sind. Gerade die letzten Tatsachen, die Veränderlichkeit des Substrates und die daraus folgenden Wechselwirkungen auf die enzymatischen Äußerungen, führen uns dazu, zum Schlusse unserer Erörterungen noch einige kolloidchemische Betrachtungen über die Vorgänge bei der Reife und Lagerung anzureihen. Denn wir haben bisher die Kondensationsprozesse meist von der chemischen Seite oder unter dem Gesichtspunkt der Fermentreaktionen betrachtet. Wie bereits H. Hoffmann[3]) betonte, finden beim Reifungsprozeß sicherlich auch physikalische Kondensationen etwa von der Art der Polymerisation oder schließlich auch mechanische in der Art von Ausfällung aus übersättigten Lösungen statt. Eine allgemein dem Kolloidchemiker geläufige Erscheinung nun ist die der zeitlichen Variabilität der kolloiden Systeme. Darunter versteht man die Eigenschaft kolloider Lösungen, sich im Verlaufe der Zeit in teils sichtbarer, teils unsichtbarer Weise zu verändern, z. B. die innere Reibung oder die Oberflächenspannung langsam zu erniedrigen oder zu erhöhen oder schließlich unter Übergang ins makroheterogene System sogar spontan auszuflocken. Derartige „Alterungserscheinungen" sind ja an Stärke- und Eiweißlösungen zur Genüge beobachtet worden. Aber nicht nur für die Sole sondern auch für die Gele und Gallerten sind Alterungserscheinungen bekannt geworden, wie ja überhaupt Gallerten in vieler Hinsicht in ihren Eigenschaften sich ähnlich wie Sole verhalten. So können in Gallerten auch Flockungen und Fällungen hervorgerufen werden. Salze beeinflussen die Erstarrungszeit der Gallerten in weitgehendem Maße, und sogar Nichtelektro-

[1]) Arch. di fisiol. 7, 593, 1909 und Rendi conti R. Accad. d. Linc. (5), 19, 659. 1910.

[2]) Diese Zeitschr. 11, 311. 1908.

[3]) Wochenschr. f. Brauerei 1907, S. 239.

Digitized by Google

lyte, welche sonst auf die Fällung von Kolloiden ohne besondere Bedeutung sind, üben nach Pauli und Rona[1]) auf die Erstarrung der Gallerten einen Einfluß aus. Auch auf die Strukturänderung (Netz- und Wabenstruktur usw.) beim Konzentrieren und Fällen von Gallerten sei hingewiesen. Oftmals lassen sich derartige Alterungs- oder Koagulationsprozesse wie Paine[2]) nachwies, zeitlich gut verfolgen. Bei den für uns in Betracht kommenden Verhältnissen ist sehr wohl damit zu rechnen, daß beim Verlauf der Reife die aus dem Sol- in den Gelzustand übergehenden Plasmakolloide in weitgehendem Maße den Alterungs- und Hysteresiserscheinungen unterworfen sind. Besonders mit Rücksicht auf die Proteine mögen diese Verhältnisse erhöhte Bedeutung besitzen. Das im Entwicklungsstadium aufgebaute, im Plasma noch gelöste Eiweiß wird bei fortschreitender Austrocknung nicht nur in den Gelzustand übergehen, sondern sicherlich, zum Teil auch unter dem Einfluß der oben erwähnten gleichzeitigen Veränderungen anderer Stoffgruppen, wie der Aschenbestandteile und der damit einhergehenden Veränderungen der physikalischen Kräfte, wie der Oberflächenspannung, immer mehr den Alterungserscheinungen unterliegen, die zu einer reversiblen bzw. irreversiblen Ausflockung endlich führen können. Von vornherein ist zu erwarten, daß äußere Einflüsse wie z. B. die Art und Weise des Trocknens während der Reife gerade solche kolloidchemische Vorgänge sehr beeinflussen müssen. Ich denke hier besonders an die Wahrnehmungen, welche man betreffs der Mehligkeit und Glasigkeit des Endosperms machte. Die Glasigkeit kann je nach den Witterungsverhältnissen während der Ernte eine verschiedene sein, auch in verschiedenen Reifestadien ist sie unterschiedlich. Wenn auch nach H. T. Brown[3]) Druckverhältnisse im Korn für die Glasigkeit verantwortlich sein sollen, so glaube ich andererseits, daß gerade die kolloidchemischen Zustandsänderungen, die je nach den äußeren Umständen und der Zeit, in welcher sie verlaufen, sehr verschieden sich abwickeln können, von besonderem Einfluß auf derartige physikalische Erscheinungen im Korn sind. Auch die Tatsache, daß ein großer Teil der Glasigkeit durch kurzes Weichen und vorsichtiges Trocknen in Mehligkeit übergeht, steht im besten Einklang mit obigen kolloidchemischen Erscheinungen. Durch das kurze Weichen wird den Plasmakolloiden Gelegenheit geboten, zu quellen, so daß sie dann beim vorsichtigen Trocknen in normaler Weise anstatt in die glasige in die mehlige Struktur übergehen.

Die leichte Beeinflußbarkeit der Plasmakolloide, besonders der Eiweißkörper und ihre Neigung, Zustands- und Strukturänderung leicht einzugehen, tritt auch noch dadurch zutage, daß sich sicherlich mehrere von ihnen in der Gegend ihres isoelektrischen Punktes befinden. Nach vielen Messungen, die wir teils mit der elektrometrischen, teils der colorimetrischen Methode im Laufe der letzten Jahre ausführten, zeigen die wässerigen Extrakte aus Cerealien eine Reaktion entsprechend einer Wasserstoff-

[1]) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 1. 1902.
[2]) Kolloidchem. Beih. 4, 24. 1912.
[3]) Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen 1890.

Digitized by Google

ionenkonzentration von etwa $10^{-6,5}$. Für Edestin z. B. wird als isoelektrischer Punkt 10^{-7} angegeben[1]). Gerade in der Gegend der isoelektrischen Zone aber sind die Kolloide gegen äußere Einwirkungen wie Neutralsalze oder sonstige die Stabilität des Systems gefährdende Einflüsse sehr empfindlich. Das isoelektrische Eiweiß zeigt ein Minimum der Oberflächenentwicklung [Bredig[2])] ein Minimum der Viscosität [Michaelis[3]), Pauli[4])], ein Maximum der Alkoholfällbarkeit, im Gegensatz zu dem positiv oder negativ aufgeladenen, stark hydratisierten Säure- und Laugeneiweiß. Auch daraus lassen sich wieder Schlüsse auf die Wechselwirkungen zwischen Substrat und Ferment, wie sie oben angedeutet wurden, ziehen.

Zum Schlusse sei noch eines kolloidchemischen Phänomens gedacht, welches auch bei der Reifung gelegentlich mit beteiligt ist, nämlich die Erscheinung der Synäresis. Darunter versteht man die spontane Ausscheidung von Wasser in tropfbar flüssiger Form aus Gallerten. Man kann auch diese Erscheinung mit den langsam verlaufenden Alterungsprozessen vergleichen. Die Folge der Synäresis sind wie dort auch Änderungen der Struktur und des Dispersitätsgrades. Bei der Lagerung der Cerealien bemerkt man oftmals das Auftreten von Wasser, das aus dem Korninnern stammt, man sagt: das Getreide schwitzt. Wenn auch der größte Teil des auftretenden Wassers auf eine Atmung des Kornes oder, wie in manchen Fällen, auf Taubildung infolge Temperaturwechsels zurückzuführen ist, so mag doch auch die Erscheinung der Synäresis der Plasmakolloide einen Teil dazu beitragen.

Soweit die chemischen und physikalischen Veränderungen während der Reife und Lagerung der Cerealien. In welcher Beziehung und Ursächlichkeit sie zu physiologischen Fragen stehen, muß dem Pflanzenphysiologen zur Entscheidung überlassen bleiben. Nur eines sei noch betont. Alle die verschiedenartigen Veränderungen während der Reife verlaufen alle im Sinne eines Aufbaues, einer Anhäufung von Arbeit und Kraft durch Speicherung von osmotisch unwirksamen, undiffusiblen und entquollenen Stoffen, aus denen bei der Keimung dann eine Reihe von Energiemöglichkeiten (osmotische, Quellungs-Oberflächenenergie usw.) herausgeholt wird. Sei es nun, daß eine rein physikalische Ursache, z. B. in Form von Störungen in der Zufuhr der Nahrung

---

[1]) Michaelis, Nernstfestschrift 1912, S. 308.
[2]) Anorganische Fermente, Leipzig 1901.
[3]) Diese Zeitschr. 27, 38, 1910; auch 25. 401, 1910.
[4]) Diese Zeitschr. 18 u. ff.

Digitized by Google

zum Korn, oder sei es, daß Reizwirkungen den gleichmäßigen Verlauf der Aufbaureaktionen bedingen, immer müssen wir uns vergegenwärtigen, daß wir im Samenkorn keine leblose Masse, sondern einen in Form der Keimlingsanlage mit Leben ausgestatteten Organismus vor uns haben, der auch im Stadium der Samenruhe, wenn auch sehr langsame und schwache, so doch ganz deutliche Lebensäußerungen zeigt. Zu diesen Lebensäußerungen gehört aber in erster Linie der Stoffwechsel, unter dem nicht bloß eine Summe chemischer Kraft zu verstehen ist, sondern auch die Fähigkeit mit inbegriffen sein muß, den Verlauf aller Prozesse im Organismus selbststeuernd (regulatorisch) zu beeinflussen[1]), in einer Weise, wie sie von Generation zu Generation vererbt wird. Wir müssen eben dem lebenden Protoplasten immer wieder besondere Fähigkeiten zuschreiben, die wir mit unseren rohen Methoden der Zertrümmerung des Organismus außerhalb desselben niemals restlos erforschen werden.

Zusammenfassung.

1. Es wird eine neue Methode der Säurebestimmung in organischen Extrakten angegeben, welche gestattet, unter Anwendung eines colorimetrischen Prinzips in ein und derselben Probe die Säure gegen zwei Indicatoren (Neutralrot und Phenolphthalein) zu titrieren. Da die neue Methode von mehreren Fehlern, die der bisherigen Art der Säurebestimmung anhaften, z. B. der Eigenfarbe der Lösung und deren Veränderung bei der Titration, frei ist, werden sehr befriedigende, gut reproduzierbare Werte erhalten.

2. Die Methode der Formoltitration nach S. P. L. Sörensen wird, da sie zum Teil unter den gleichen Schwächen wie sie unter 1. genannt sind, leidet, auf dem gleichen colorimetrischen Prinzip fußend, verbessert und als Ausgangspunkt der Titration nicht mehr das Tüpfeln auf Azolithminpapier, sondern Titration auf Neutralrot eingeführt. Der Endpunkt der Titration wird durch Einführung einer Standardlösung genau festgelegt, so daß gleichmäßig reproduzierbare Resultate erzielt werden.

3. Mit Hilfe der beiden Methoden wurden verschiedene Proben von Gerste, Weizen, Hafer und Roggen auf die Veränderungen in Säuregehalt, formoltitrierbarem Stickstoff und auf

[1]) Siehe Höber, Die physik. Chemie der Zelle und Gewebe, 15. Kap.

Digitized by Google

etwaige Änderungen in den enzymatischen Verhältnissen von der späteren Gelbreife zur Vollreife und nach zweimonatiger Lagerung untersucht. Es ergab sich: Der Gehalt an Säure und formoltitrierbaren Substanzen nimmt von der Gelbreife zur Vollreife stärker, während der Lagerung schwächer, durchwegs ab, und zwar bei den Proben, die am weitesten von ihrem Dauerzustand, dem der vollen Keimreife, entfernt sind, am meisten. Die Abnahme dieser beiden Körpergruppen hat ihren Grund darin, daß die Säure in organische Bindung übergeht, während die formoltitrierbaren Körper eine Kondensation zu höher komplexen Verbindungen erfahren.

Insoweit diese Ergebnisse einen Schluß auf die enzymatischen Verhältnisse zulassen, erfahren diese während der Reife und Lagerung mehrfache Veränderungen. Bei den meisten Proben nimmt die enzymatische Kraft mit fortschreitender Keimreife innerhalb des untersuchten Zeitabschnittes zu, bei einigen im ersten Stadium ab, um dann wieder zuzunehmen, während sie bei den Proben, die in den einzelnen Stadien keine Unterschiede in ihrem Reifegrad aufweisen, ziemlich konstant ist. In Verbindung mit diesen Wahrnehmungen bezüglich der enzymatischen Verhältnisse im reifenden und ruhenden Korn, werden die Prozesse, die sich allgemein in diesen Stadien abspielen, von verschiedenen chemischen, physikalischen und kolloidchemischen Gesichtspunkten aus betrachtet.

Einige Versuche über Trocknung des Getreides ergaben, daß eine Trocknung im Sinne der Reifungsförderung wirkt und daß der Effekt nicht im Wasserverlust, sondern in einer Reizwirkung der Wärme, verbunden mit einer Beeinflussung der Reaktionskinetik, zu suchen ist.

Die zur Untersuchung dienenden Proben entstammten alle dem ziemlich normalen Jahrgang 1918. Es haben also die dargelegten Verhältnisse und gewonnenen Versuchsergebnisse vorerst nur für einen normalen Verlauf der Reifung Geltung. Wie die Verhältnisse für andere Jahrgänge, in welchen die Witterungsverhältnisse einen normalen Reifungsverlauf nicht zustandekommen lassen, liegen werden, müssen weitere Untersuchungen lehren. Daß aber die in vorliegender Arbeit eingeschlagenen Untersuchungsmethoden angetan sein können, hier Klarheit zu schaffen, mag aus einigen praktischen Erfahrungen über abnorme

Digitized by Google

Jahrgänge, z. B. 1904 und 1911, hervorgehen, worüber W. Windisch[1]) und A. Reichard[2]) berichten. Alle die Erscheinungen, welche man bei der Verarbeitung von solchen unterreifen, anormalen Gersten, wie sie diese beiden Jahrgänge lieferten, in der Mälzerei und Brauerei machte, deuten darauf hin, daß die Kondensations- und Umwandlungsprozesse infolge frühzeitigen Austrocknens des Korns vorzeitig haltgemacht hatten, und infolgedessen eine Unterreife zustande kam, die dadurch charakterisiert ist, daß im Korn größere Mengen niedrig molekularer Bausteine der verschiedenen Körperklassen präexistierend sich vorfinden. Daß in physiologischer Beziehung diese Körper auf das Wachstum des Korns in der Mälzerei und auf die Eigenschaften des Malzes und damit des Bieres einen erheblichen Einfluß ausüben werden, ist ohne weiteres verständlich.

Sicherlich werden auch solche abnorme Jahrgänge in bezug auf die Reifung der Cerealien auch in anderen Gewerben, bei welchen die Cerealien eine Rolle spielen, sich bemerkbar machen. In dieser Richtung sei nur des Bäckereigewerbes gedacht, wo ohne Zweifel auch die Backfähigkeit des Mehles in hohem Grade vom Reifezustand des Kornes abhängen wird.

[1]) Wochenschr. f. Brauerei 1912, Nr. 12.

[2]) Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen **35**, Nr. 29 u. 30. 1912.

Digitized by Google

Chemische und morphologische Studien über das Cholesterin und die Cholesterinester in normalen und pathologisch veränderten Organen.

Von

Johan Fex.

(Aus dem Pathologischen und dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 16. Januar 1920.)

I. Einleitung und Geschichtliches.

Unter den Forschungsgebieten, die während der letzten 15—20 Jahre das Interesse sowohl der Biochemiker als der Pathologen auf sich gezogen haben, hat das Studium der Lipoide und ihrer Rolle im Organismus einen hervorragenden Platz eingenommen. Besonders eingehend hat man sich in letzter Zeit mit dem Cholesterin und seinen Estern beschäftigt und den Ursprung dieser Stoffe sowie die Rolle, die sie im Organismus spielen, zu erforschen gesucht.

Es sind vor allem Chauffard in Frankreich und Aschoff in Deutschland nebst ihren Schülern und Mitarbeitern gewesen, die zu einer Erweiterung unserer Kenntnis von dem Vorkommen dieser Stoffe im menschlichen Organismus beigetragen und das Verständnis ihrer sicherlich großen biologischen Bedeutung gefördert haben.

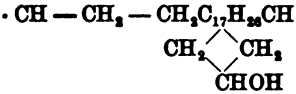
Ein erhöhtes Interesse erhielten die hierhergehörigen Fragen durch einige, experimentelle Untersuchungen, die von russischen Forschern, Ignatowski, Starokadomski, Chalatow u. a., ausgeführt wurden. Es gelang ihnen, bei Kaninchen durch Fütterung mit cholesterinreicher Nahrung oder mit reinem Cholesterin Veränderungen an der Aorta und dem Gefäßsystem hervorzurufen, die denen ähnlich waren, die wir bei der menschlichen Arteriosklerose zu sehen gewohnt sind.

Das Cholesterin gehört zu der Gruppe von Stoffen, die in der Biochemie als Lipoide bezeichnet werden, nach Bang[1]) charakterisiert dadurch, daß sie in Alkohol, Äther, Chloroform, Benzol u. a. organischen Lösungs-

[1]) J. Bang, Chemie und Biochemie der Lipoide. Wiesbaden 1911.

Digitized by Google

mitteln löslich sind. Betreffs des chemischen Charakters des Cholesterins will ich nur erwähnen, daß es nach Windaus'[1]) Untersuchungen als ein einwertiger, einfach ungesättigter sekundärer Alkohol aufzufassen ist, dessen Hydroxylgruppe in einem hydrierten Ring zwischen zwei Methylgruppen steht, außerdem ist in ihm eine Isopropyl- und eine Vinylgruppe enthalten. Die Formel wäre demnach etwa folgende:



Das Cholesterin unterscheidet sich durch seinen chemischen Bau von allen anderen innerhalb des menschlichen Körpers vorkommenden Stoffen und nimmt auf diese Weise eine Sonderstellung ein, wohlverschieden von den übrigen Lipoiden.

Betreffs des Ursprungs und der Bildungsweise des Cholesterins wissen wir trotz aller Untersuchungen recht wenig. Englische Forscher, Doree[2]) Gardner[3]), Ellis[4]) u. a., die diese Fragen klarzustellen versucht haben, halten es für wahrscheinlich, daß das Cholesterin bei pflanzenfressenden Tieren durch eine Umbildung des in Pflanzen vorkommenden, dem Cholesterin nahestehenden Phytosterins zustande kommt, daß aber eine synthetische Neubildung dieses Stoffes wenigstens bei höheren Tieren nicht vorkommt. Dagegen wissen wir durch zahlreiche Untersuchungen, daß er in größerer oder geringerer Menge in allen Geweben unseres Körpers und im Blute vorkommt, weshalb man nunmehr allgemein das Cholesterin als zu den konstanten Bestandteilen der Zellen gehörig ansieht. Es kommt dort teils als freies Cholesterin, wahrscheinlich an andere Lipoide und möglicherweise auch an Eiweißstoffe gebunden, teils in Form fester Verbindungen mit Fettsäuren als Cholesterinfettsäureester vor.

Das Cholesterin wird unserem Körper mit der Nahrung zugeführt, im Darm resorbiert und verestert und dann für verschiedene Zwecke in Anspruch genommen. Beim Menschen kommt es in der Galle vor und wird mit dieser in den Darmkanal ausgeschieden, wo ein Teil davon in Koprosterin umgewandelt, ein Teil sicherlich aufs neue resorbiert wird.

Dieser hier geschilderten Auffassung von dem Ursprunge des Cholesterins steht die zuletzt von Chauffard[5]) und seinen Schülern verfoch-

[1]) Biochem. Handlexikon, Bd. III, 268. 1911.

[2]) Doree and Gardner, Proc. of the Roy. Soc. **80**, 212, 227. 1908. **81**, 109. 1909.

[3]) Ellis and Gardner, Proc. of the Roy. Soc. **81**, 129, 505. 1909. **84**, 461. 1912. **85**, 385. 1912. **86**, 13. 1913.

[4]) Fraser and Gardner, Proc. of the Roy. Soc. **81**, 230. 1909. **82**, 559. 1910.

[5]) Chauffard, Semaine méd. **16**, 193. 1912. Chauffard, Richet et Grigaut, Compt. rend. de la soc. de biol. 25. II. 1911, S. 276. Chauffard, Laroche et Grigaut, Compt. rend. de la soc. de biol. 7. I., 20; 14. I., 70; 21. I., 108; 1. IV., 536. 1911. 16. et 17. II., 223; 265; 6. VII., 20. 1912; 10. V., 1005. 1913. — Semaine méd. **49**, 557. 1911.

Digitized by Google

tene Ansicht gegenüber, daß das Cholesterin außerdem noch innerhalb des Organismus gebildet wird. Nach ihnen spielen die Nebennieren, in denen man unter normalen Verhältnissen Cholesterin und Cholesterinester in reichlicher Menge findet, sowie möglicherweise das Corpus luteum eine wichtige Rolle innerhalb des Cholesterinumsatzes des Organismus und sind nicht nur als Ablagerungsstätten für Cholesterin und dessen Ester, sondern als Organe anzusehen, wo diese Stoffe neugebildet werden, um dann an das Blut abgegeben zu werden. Diese Theorie ist jedoch nicht unwidersprochen geblieben, und besonders von Aschoff[1]) und seinen Schülern sind scharfe Einwände gegen diese Ansichten erhoben worden. Ich gehe hier nicht auf diese an sich sehr interessante Diskussion ein, erwähnt sei nur, daß Landau[2]), der die Auffassung der Aschoffschen Schule präzisiert, betont, daß die Nebennierenrinde nicht eine Erzeugungsstelle für Cholesterin, sondern ein Depotorgan für dasselbe ist, indem das Cholesterin auf den Blutwegen der Nebennierenrinde zugeführt wird. Diese hat nach Landau Bedeutung als intermediäres Organ im Dienste des Cholesterinumsatzes, und ihre Stellung als solches läge in ihrer Korrelation mit dem Nebennierenmark und dem an Lipoiden armen sympathischen Nervensystem.

Ob das Cholesterin innerhalb des Körpers verbrannt wird oder ob es zum Aufbau anderer Stoffe dient, darüber wissen wir nichts mit Sicherheit. Der einzige Stoff im Organismus, der in chemischer Hinsicht als dem Cholesterin nahestehend bezeichnet werden kann, ist die Cholalsäure, und Windaus nimmt an, daß diese möglicherweise ein Oxydationsprodukt des Cholesterins sei; doch ist die Verwandtschaft zwischen Cholesterin und Cholalsäure noch nicht sicher erwiesen. Für eine solche Möglichkeit sprechen ferner die Untersuchungen, die Hammarsten[3]) an Gallensäuren beim Hai (Scymnus borealis) ausgeführt hat, welche eine Mittelstellung zwischen Cholesterin und Cholalsäure einnehmen.

Das Vorkommen und der Gehalt von Cholesterin im Blute und im Serum ist besonders eingehend von dem französischen Kliniker Chauffard und seinen Schülern studiert worden. Sie arbeiteten mit einer von Grigaut[4]) ausgearbeiteten colorimetrischen Methode, mittels welcher man den Gesamtgehalt an Cholesterin in kleinen Mengen Blut oder Serum bestimmen konnte. Ihre Untersuchungen zeigten, daß der Cholesteringehalt in Blut oder Serum von gesunden Individuen sich auf einem ziemlich konstanten Niveau hielt. Eine Ausnahme bildete indessen das Serum schwangerer Frauen, das eine Zunahme mit den größten Werten während der letzten Schwangerschaftsmonate aufwies. Ferner fanden die genannten Forscher eine Zunahme des Cholesteringehalts des Bluts, eine Hypercholesterinämie, bei gewissen krankhaften Zuständen, vor allem bei einigen Nephritiden und in gewissen Fällen von Diabetes mellitus. Bei chronischen Infektions-

[1]) Wiener klin. Wochenschr. **16**, 559. 1911.
[2]) Die Nebennierenrinde. Jena 1915.
[3]) Siehe Bang, Chemie und Biochemie der Lipoide. Wiesbaden 1911.
[4]) Le Cycle de la Cholestérinémie. Paris 1913.

Digitized by Google

krankheiten fand man eine Hypocholesterinämie, bei akuten Infektionskrankheiten eine Herabsetzung des Cholesteringehalts während des Fieberstadiums, auf die mit dem Fallen der Temperatur eine mäßige Steigerung folgt. Chauffard und seine Schüler wollen diese Erscheinungen in der Weise erklären, daß das Cholesterin das Vermögen besäße, die Wirkung im Körper gebildeter toxischer Produkte zu vermindern oder aufzuheben, ob diese nun durch infektiöse Prozesse oder durch Störungen des Stoffwechsels entstanden sind. Sie gehen hierbei von Ransoms[1]) Beobachtung aus, daß dem Cholesterin das Vermögen eignet, die hämolytische Wirkung der Saponine aufzuheben, und von Pribams[2]) Versuchen, welche zeigten, daß das antihämolytische Vermögen des Serums gegenüber Saponinen nach Fütterung mit Cholesterin und Cholesterinestern zunahm. Diese hier nur in allergrößter Kürze erwähnten Untersuchungen Chauffards und seiner Mitarbeiter sind später in ihren Resultaten von anderen Forschern bestätigt worden, von denen Hermann und Neumann[3]), Henes[4]), Klinckert[5]), Bürger und Beumer[6]), Stepp[7]) und Port[8]) genannt seien. Auf ihre Untersuchungen will ich hier nicht näher eingehen, werde sie aber kurz, soweit sie für meine Arbeit Bedeutung haben können, im folgenden berühren.

In der Pathologie hat sich gleichfalls das Interesse für das Cholesterin und seine Ester frühzeitig geltend gemacht, wenn es auch recht lange dauerte, ehe es morphologisch gelang, diese Stoffe von den übrigen Lipoiden zu scheiden. Die Cholesterinester besitzen jedoch eine Eigenschaft, die es leicht macht, bei mikroskopischer Untersuchung von Geweben sie von anderen Lipoiden zu unterscheiden; sie bilden nämlich doppelbrechende Krystalle, die bei Erwärmung schmelzen und ihr Doppelbrechungsvermögen verlieren, nach Abkühlung aber in doppelbrechende Tropfen übergehen, welche nach längerer oder kürzerer Zeit wieder die Krystallform annehmen. Diese Erscheinungen lassen sich mit Leichtigkeit nicht nur an frischem Material von an Cholesterinestern reichen Geweben, sondern auch an Schnitten von formalingehärtetem Material beobachten.

Schon 1858 erwähnte Mettenheimer[9]) das Vorkommen doppelbrechender Tropfen u. a. in atheromatösen Herden in der Aorta und vermutete, daß die doppelbrechende Substanz etwas mit Cholesterin zu tun hätte. Es waren indessen erst Kaiserlings und Orglers[10]) Untersuchungen,

[1]) Dtsch. med. Wochenschr. **27**, 194. 1901.
[2]) Diese Zeitschr. **1**, 413. 1906.
[3]) Diese Zeitschr. **43**, 47. 1912.
[4]) Dtsch. Archiv f. klin. Med. **111**, 122. 1913.
[5]) Berl. klin. Wochenschr. **18**, 820. 1913.
[6]) Berl. klin. Wochenschr. **3**, 112. 1913.
[7]) Münch. med. Wochenschr. **29**, 781. 1918.
[8]) Dtsch. Archiv f. klin. Med. **128**. 1918.
[9]) Siehe Aschoff, Zieglers Beiträge z. allg. Path. u. pathol. Anat. **47**, 1. 1910.
[10]) Virchows Archiv **167**, 296. 1902.

Digitized by Google

durch die das Studium der doppelbrechenden Substanzen, ihrer physikalischen und mikroskopischen Eigenschaften, einen neuen Aufschwung nahm. Kaiserling und Orgler beobachteten bei Untersuchung frischen Sektionsmaterials doppelbrechende Tropfen in normaler Nebennierenrinde, in atheromatösen Intimaherden bei Arteriosklerose, in Nieren bei chronischen Nephritiden usw. Löhlein[1]) studierte an formalingehärtetem Material die doppelbrechenden Fettsubstanzen in Amyloidnieren und in Nieren bei chronischen Nephritiden. Indessen kannte man noch nicht die chemische Natur dieser doppelbrechenden Stoffe, sondern man faßte sie als „Protagon" auf. In einer Arbeit „Über Protagon und über die große weiße Niere" beschreibt Stoerk[2]) das Vorkommen doppelbrechender Krystalle und Tropfen teils in den Epithelien der gewundenen Kanälchen, teils in großen, in den Niereninterstitien belegenen Zellen, und aus solchen an doppelbrechenden Krystallen reichen Nieren konnte Panzer[3]), der von Stoerk Material erhielt, ein stickstoff- und phosphorfreies Präparat isolieren, das aus kleinen, farblosen, doppelbrechenden Krystallen bestand, welche von ihm als Cholesterinfettsäureester identifiziert wurden.

Derjenige, der eigentlich die Frage nach dem morphologischen Auftreten von Cholesterinestern zur Diskussion aufnahm, war Aschoff[4]), der in seiner 1910 erschienenen Arbeit „Zur Morphologie der lipoiden Substanzen" die pathologische Bedeutung des Auftretens der Cholesterinester in den Zellen betont. Er unterscheidet, was zuvor nicht geschehen, zwischen dem physiologischen oder pathologischen Auftreten von Fett in gewöhnlichem Sinne, also Glycerinfettsäureestern, und dem Auftreten von Cholesterinestern. Aschoffs Schüler Kawamura[5]) geht dann in einer größeren Arbeit „Die Cholesterinesterverfettung" näher auf die morphologische Unterscheidung verschiedener Lipoide auf Grund ihrer verschiedenen mikrochemischen und physikalischen Eigenschaften ein und weist das Vorkommen von Cholesterinestern in Organen verschiedener Tierklassen sowie beim Menschen unter normalen und pathologischen Verhältnissen nach. Nach Kawamura werden die Cholesterinester außer durch ihre Doppelbrechung dadurch gekennzeichnet, daß sie von Nilblausulfat schwach rot, von Sudan schwach gelbrot gefärbt werden, bei Anwendung der Färbungsmethoden Smith-Dietrichs, Ciaccias und Fischlers dagegen keine Beeinflussung zeigen. Kawamura entwickelt des weiteren Aschoffs Hypothese, daß es sich bei morphologisch wahrnehmbarem Auftreten von Cholesterinestern in den Zellen um eine Zufuhr von außen her handle, und betont die verschiedenen Möglichkeiten für eine Infiltration. Kaiserling und Orgler hatten nämlich zuvor es für das wahrscheinlichste gehalten, daß ein Auftreten von doppelbrechenden

[1]) Virchows Archiv **180**, 1. 1905.

[2]) Sitzungsberichte d. Kais. Akad. d. Wissenschaften in Wien **115**, 31. 1906.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **48**, 519. 1906.

[4]) Zieglers Beiträge z. allg. Path. u. pathol. Anat. **47**, 1. 1910.

[5]) Die Cholesterinesterverfettung. Jena 1911.

Digitized by Google

Substanzen in den Zellen nicht durch eine wirkliche Vermehrung, sondern nur durch eine Veränderung dieser Stoffe, so daß sie sichtbar würden, bedingt sei. Stoerk nahm an, daß die doppelbrechenden Stoffe in den von ihm untersuchten krankhaft veränderten Nieren durch Zerfall des Protoplasmas der Zellen entständen. Pinkus und Pick[1]), die in Xanthomherden in der Haut doppelbrechende Substanz in reichlicher Menge fanden, meinten dagegen, daß die doppelbrechenden Stoffe hier den Zellen von außen her zugeführt würden und daß es sich demnach um eine Infiltration handle.

Aschoff konnte sich indessen für seine Auffassung auf einige Untersuchungen von Windaus[2]) berufen, der im Auftrage Aschoffs quantitativ-chemisch die Menge von freiem und als Ester gebundenem Cholesterin teils in zwei normalen Nieren und teils in drei Amyloidnieren bestimmte, von welch letzteren die eine bei mikroskopischer Untersuchung doppelbrechende Substanz nur in geringer Menge, die zwei übrigen in sehr reichlicher Menge zeigten. Mit Hilfe der von ihm ausgearbeiteten Digitoninmethode fand Windaus, daß der Gehalt von freiem Cholesterin in den beiden normalen Nieren 0,26% und 0,22%, von gebundenem 0,012% und 0,030% war, berechnet für das Gewicht des feuchten Organs. Bei den Amyloidnieren fand sich in der einen mit morphologisch geringer Menge doppelbrechender Substanz 0,37% freies und 0,09% gebundenes Cholesterin, in den beiden anderen mit sehr reichlicher Menge doppelbrechender Substanz 0,32% bzw. 0,33% freies und 0,55% bzw. 0,65% gebundenes Cholesterin. Diese Werte Windaus' lassen deutlich erkennen, daß der morphologisch wahrnehmbaren Zunahme der Cholesterinester eine quantitative chemisch nachweisbare entspricht, sowie auch, daß man aus dem morphologischen Befund eine gewisse quantitative Vorstellung von der Menge der Cholesterinester in einem Gewebe erhalten kann. Ferner zeigen diese Untersuchungen, daß der Gehalt an freiem Cholesterin ungefähr derselbe ist in den normalen und in den krankhaft veränderten Nieren, weshalb man kaum vermuten kann, daß das freie Cholesterin zur Bildung der vermehrten Menge Cholesterinester in den Amyloidnieren gedient haben sollte, sondern man ist, wie Aschoff betont, zu der Annahme gezwungen, daß die Cholesterinester von anderwärts, wahrscheinlich vom Blute her, zugeführt worden sind.

Die Ergebnisse von Aschoffs und Kawamuras grundlegenden morphologischen Arbeiten sind von späteren Forschern auf diesem Gebiete allgemein bestätigt worden, und die von Aschoff aufgestellte Hypothese betreffs der Bedingungen für das Zustandekommen einer Cholesterinesterverfettung ist nicht widerlegt worden. Wacker und Hueck[3]) sowie Landau und Mc Nee[4]), die den Gehalt der menschlichen Nebennieren an freiem und als Ester gebundenem Cholesterin quantitativ chemisch

[1]) Dtsch.med. Wochenschr. **33**, 1426. 1908.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **65**, 110. 1910.
[3]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **71**, 373; **74**, 416. 1913.
[4]) Zieglers Beiträge z. allg. Path. u. pathol. Anat. **58**, 667. 1914.

Digitized by Google

bestimmten und gleichzeitig damit morphologische mikrochemische Untersuchungen an denselben Organen ausführten, konnten konstatieren, daß auch betreffs der Nebennieren der quantitative Gehalt an Cholesterinestern mit dem morphologischen Befund wohl übereinstimmte.

Thaysen[1]) untersuchte auf dieselbe Weise Nebennieren von Pferd und Ochse und fand betreffs der ersteren eine gute Übereinstimmung zwischen den Befunden bei der chemischen und bei der morphologischen Untersuchung, dagegen konnte er in den Ochsennebennieren in keinem seiner Fälle morphologisch Cholesterinester beobachten, trotzdem er in einem der Fälle einen Wert bei der chemischen quantitativen Bestimmung erhielt, der den in den übrigen Fällen erhaltenen um ein Mehrfaches überstieg. Thaysen bezweifelt daher stark, daß die morphologische Untersuchung zu einer sicheren Auffassung von dem wirklichen Gehalt von Cholesterinestern in den fraglichen Organen führen könne, und meint, daß nur die quantitativen chemischen Untersuchungen zuverlässige Auskünfte zu liefern vermögen.

Wie einleitungsweise erwähnt, ist das Interesse für das Cholesterin und seine Bedeutung innerhalb des Organismus in hohem Grade durch die Entdeckungen gesteigert worden, die von russischen Forschern gemacht worden sind. Ignatowski[2]) traf bei Kaninchen, die mit animalischer Nahrung gefüttert worden waren, deutliche Veränderungen in der Aorta an, und Starokadomski[3]) fand bei Fütterung von Kaninchen mit Hühnereigelb Veränderungen in der Aorta, die hauptsächlich in der Intima lokalisiert waren und sich in einer Hyperplasie des elastischen Gewebes und in einer Ablagerung von Fettsubstanzen äußerten. Stuckey[4]) führte durch Fütterung von Kaninchen mit verschiedenen Arten animalischer Nahrung den Nachweis, daß es vor allem Hühnereigelb war, das diese Aortaveränderungen hervorrief. Chalatow[5]) erzielte bei Kaninchen durch Darreichung von Hühnereigelb außer Aortaveränderungen eine Anhäufung von fettähnlichen Substanzen in der Leber, die bei Untersuchung frischen Präparats sich als aus doppelbrechenden Tropfen bestehend erwiesen. Dieser Befund veranlaßte Chalatow, zusammen mit Anitschkow[6]) Kaninchen mit reinem Cholesterin, gelöst in Sonnenblumenöl, zu füttern, welches Öl allein keine krankhaften Veränderungen im Kaninchenorganismus hervorrief. Das Öl mit dem Cholesterin wurde den Tieren mittels eines Schlauches zugeführt, und die Tiere erhielten im übrigen gewöhnliche Nahrung. Sie erhielten hierbei dieselben Veränderungen bei den Kaninchen wie vorher bei Fütterung mit Hühnereigelb und hatten demnach deutlich gezeigt, daß es das im Hühnereigelb enthaltene Cholesterin war, das die obenerwähnten Veränderungen im Kaninchenorganismus hervorrief.

---

[1]) Centralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **26**, 433. 1915.

[2]) Virchows Archiv **198**, 248. 1909.

[3]) Nach Anitschkow und Chalatow. Siehe unter [6]).

[4]) Centralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **23**, 910. 1912.

[5]) Virchows Archiv **207**, 192; Zieglers Beiträge z. allg. Path. u. pathol. Anat. **57**, 85. 1913.

[6]) Centralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **24**, 1. 1913.

Digitized by Google

Später hat Anitschkow[1]) die Veränderungen in der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesterinsteatose und Krylow[2]) die Veränderungen in den Nebennieren beim Kaninchen näher studiert. Als Resultat haben die Untersuchungen der russischen Forscher ergeben, daß Fütterung von Kaninchen mit cholesterinreicher animalischer Nahrung oder mit reinem Cholesterin eine starke Anhäufung von Lipoiden, vor allem doppelbrechenden Cholesterinestern, in der Nebennierenrinde, in den Leberzellen und in den Endothelzellen von Leber, Milz und Lymphdrüsen hervorruft, und daß ferner eine Ablagerung von lipoiden Substanzen in der Aortaintima auftritt, welch letztere außerdem eine elastische Hyperplasie und im großen und ganzen dieselben Veränderungen aufweist wie die, welche man bei der menschlichen Arteriosklerose zu finden gewohnt ist.

Wacker und Hueck[3]) fütterten Kaninchen mit in Hafer gemischtem, reinem Cholesterin und fanden bei diesen Tieren einen im Verhältnis zu normalen Tieren vermehrten Gehalt sowohl von Cholesterin als von Cholesterinestern im Blute sowie eine Anhäufung von doppelbrechenden Fettsubstanzen in Nebennieren, Leber und an anderen Stellen, ferner in der Aorta deutliche Veränderungen oben angegebener Art. Sie konnten in den Organen außerdem einen über das Normale beträchtlich erhöhten Cholesteringehalt nachweisen. Auch bei Hunden und Katzen, die eine reichliche Menge Cholesterin in ihrer Nahrung erhielten, konnten Wacker und Hueck eine pathologische Steigerung des Cholesteringehalts im Blute und in den Organen, dagegen aber keine Aortaveränderungen finden. Die Ursache für das Fehlen dieser letzteren Veränderungen erblickten Wacker und Hueck in dem Umstande, daß die Cholesterinfütterung bei ihren Versuchen nur 2 Monate gedauert hatte.

Schon vorher hatten Grigaut und L'Huillère[4]) gefunden, daß bei Hunden durch Fütterung mit cholesterinreicher Nahrung eine Steigerung des Cholesteringehalts im Blute auftrat, aber diese Autoren äußern sich nicht darüber, ob es zu einer Anhäufung von Cholesterin in den Organen kommt. Anitschkow gelang es auch nicht, bei Ratten Aortaveränderungen durch Cholesterinfütterung hervorzurufen, obwohl die Fütterung auf eine Dauer bis zu 5 Monaten ausgedehnt wurde. Ob fleisch- und pflanzenfressende Tiere sich betreffs einer enteralen Zufuhr von Cholesterin verschieden verhalten, läßt sich an der Hand der obenerwähnten Angaben schwer beurteilen. Landau betont, daß wahrscheinlich ein wenigstens relativer Unterschied zwischen Fleisch- und Pflanzenfressern in dieser Hinsicht besteht, so daß bei den ersteren nicht so leicht eine Anhäufung von Cholesterin im Blute und in den Geweben entsteht.

Es liegt nahe, ausgehend von den oben angeführten Untersuchungen und im Hinblick auf die krankhaften Veränderungen, die bei experimenteller Fütterung von Versuchstieren mit Cholesterin entstehen, sich zu fragen,

[1]) Zieglers Beiträge z. allg. Path. u. pathol. Anat. **56**, 379. 1913.
[2]) Zieglers Beiträge z. allg. Path. u. pathol. Anat. **58**, 434. 1914.
[3]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **74**, 416. 1913.
[4]) Compt. rend. de la soc. de biol. 20. VII., 202. 1912.

Digitized by Google

ob der Cholesteringehalt der menschlichen Organe unter krankhaften Verhältnissen Abweichungen vom Normalen zeigt. Ein Organ, in welchem man morphologisch leicht das Cholesterin studieren kann, sind die Nebennieren, bei denen man normalerweise ein Vorkommen von doppelbrechenden Cholesterinestern beobachtet. Kawamura fand so doppelbrechende Substanzen in der Nebennierenrinde schon bei 4—5 Monate alten Föten und traf diese Stoffe bei Föten und Neugeborenen wie auch bei Erwachsenen in sämtlichen verschiedenen Schichten der Nebennierenrinde an. Über den quantitativen Gehalt von doppelbrechenden Substanzen in der Nebennierenrinde äußert er sich nicht, gibt aber doch an, daß er isotropes und anisotropes Fett in reichlicher Menge in einem Falle von Nephritis fand. Dagegen war der Fettgehalt vermindert bei chronischer Tuberkulose, bei Typhus sowie bei Diabetes. Bei Inanition konnte er keine Verminderung des Fettgehalts konstatieren.

Karwicka[1]) untersuchte 37 menschliche Nebennieren und gibt an, daß er einen Einfluß des allgemeinen Ernährungszustandes auf den Gehalt von anisotropem Fett in der Nebennierenrinde nicht feststellen konnte, auch fand er nicht, daß die Art der Krankheit von offensichtlicher Bedeutung war. Dagegen fand er in Nebennieren von Kindern eine geringere Menge doppelbrechenden Fettes als bei Erwachsenen und meint, daß das Alter eine gewisse Rolle spiele. Albrecht und Weltmann[2]) fanden einen vermehrten Gehalt von doppelbrechendem Fett bei Arteriosklerose, Herzfehlern, chronischen Nierenleiden u. a. Krankheiten sowie bei schwangeren Frauen; einen verminderten Gehalt dagegen bei verschiedenen infektiösen Prozessen. Chauffard, Laroche und Grigaut[3]) haben eine Anzahl quantitativer chemischer Bestimmungen des totalen Cholesteringehalts in menschlichen Nebennieren ausgeführt. Sie fanden Werte zwischen 4,03% und 7,74%, im Mittel 5,96%, in Fällen, wo die Individuen einen vermehrten Blutdruck gehabt hatten, bei chronischen Nephritiden zwischen 3,44% und 7,97%, im Mittel 5,28%, bei akuten Infektionskrankheiten im Mittel 0,96%. Chauffard und seine Mitarbeiter stellten einen hohen Cholesteringehalt in den Nebennieren in direkten Zusammenhang mit der Hypertonie und der Nephrosklerose.

Wacker und Hueck[4]), deren Untersuchungen ich oben erwähnt habe, glaubten konstatieren zu können, daß das freie Cholesterin ein integrierender, stabiler Bestandteil der Nebennierenrinde sei, während die Cholesterinester labile Elemente seien. Sie fanden ferner eine sehr reichliche Menge von Cholesterinestern bei Arteriosklerose, chronischen Nierenleiden, Diabetes sowie während der Schwangerschaft; dagegen einen stark herabgesetzten Gehalt bei allen längere Zeit bestehenden infektiösen und septischen Prozessen.

---

[1]) Zieglers Beiträge z. allg. Path. u. pathol. Anat. **50**, 437. 1911.

[2]) Wien. klin. Wochenschr. **14**, 483. 1911. Zieglers Beiträge z. allg. Path. u. pathol. Anat. **56**, 278. 1913.

[3]) Compt. rend. de la soc. de biol. 6. VII. 1912, S. 23.

[4]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **71**, 373. 1913.

Digitized by Google

Landau und McNee[1]) kommen in einer ähnlichen Untersuchung zu ungefähr demselben Ergebnis. Sie erhalten außerdem recht hohe Werte für die Cholesterinester in ein paar Fällen, wo der Tod durch Selbstmord eingetreten, wo also die Organe als normal bezeichnet werden konnten. Ferner meinen sie, daß, wenn auch das freie Cholesterin stabiler als das als Ester gebundene ist, doch eine gewisse Proportionalität zwischen diesen beiden besteht, so daß, wenn die Cholesterinester zunehmen, auch das freie Cholesterin zunimmt. Andererseits könne das gebundene leichter verschwinden als das freie, weshalb die Werte des freien Cholesterins eine Auskunft über den Cholesterinreichtum des Organs zu einem vom Tode weiter abgelegenen Zeitpunkt liefern könnten, während der Wert der Cholesterinester mehr den Zustand unmittelbar vor dem Tode abspiegle.

Knack[2]) hat versucht, das Verhältnis des Cholesterins zur Arteriosklerose festzustellen, und untersuchte zu diesem Zweck die Nebennieren von 250 Sektionsfällen; darunter 44 Fällen mit starker und 59 Fällen mit mäßigem Grade von Arteriosklerose. Er fand dabei kein erhöhtes Gewicht der Nebennieren bei Arteriosklerose, auch konnte er nicht finden, daß die Nebennierenrinde eine größere Breite im Querschnitt hatte als bei normalen Fällen. Nur in einem Falle von Arteriosklerose fand er hochgradige Veränderungen in der Nebennierenrinde mit starker schaumiger Degeneration, und von einem Aussehen, das dem Bilde der Nebennierenrinde bei experimenteller Cholesterinsteatose bei Kaninchen ähnelte. Knack hat ferner einige Fütterungsversuche an Kaninchen teils mit reinem Cholesterin, teils mit Milch und Eiern und teils mit Ätherextrakt von Nebennieren ausgeführt, die Individuen mit oder ohne arteriosklerotische Veränderungen entnommen waren. Das reine Cholesterin wurde den Tieren in frisches Brot gemischt verabreicht, außerdem erhielten sie gewöhnliches Grünfutter; in derselben Weise erhielten andere Tiere die erwähnten Ätherextrakte. Bei allen Tieren, die mit Milch und Eiern gefüttert worden waren, entstanden hochgradige Veränderungen sowohl in der Aorta als in den übrigen Organen. Von den 12 Kaninchen, die reines Cholesterin erhielten, zeigten nur zwei deutliche Veränderungen, und diese beiden Tiere hatten außerdem krankhafte Prozesse infektiöser Art, das eine Coccidiose, das andere eine Staphylokokkeninfektion. In 6 von 8 Fällen erhielt Knack deutliche Gefäßveränderungen bei den Versuchstieren, die mit Ätherextrakt von Nebennieren arteriosklerotischer Individuen gefüttert worden waren, desgleichen in 3 von den 9 Fällen, wo die Kaninchen Ätherextrakt von Nebennieren nicht arteriosklerotischer Individuen erhielten. Knack zieht aus seinen Versuchen den Schluß, daß reines Cholesterin, zusammen mit der gewöhnlichen Nahrung der Tiere verfüttert, nicht Arteriosklerose bei Kaninchen hervorruft, sofern nicht andere schädliche Momente hinzukommen. Zu diesen rechnet er teils Infektionen irgendwelcher Art, teils animalische Produkte in der Nahrung, z. B. Verfütterung von Milch und Eigelb, die auf irgendeine Weise toxisch wirken können. Betreffs Anitschkows

[1]) Zieglers Beiträge z. allg. Path. u. pathol. Anat. 58, 667. 1914.
[2]) Virchows Archiv 220, 36. 1915.

Digitized by Google

Versuche mit Verfütterung von reinem Cholesterin in Sonnenblumenöl meint Knack, daß die Möglichkeit nicht auszuschließen sei, daß das Öl eine gewisse Bedeutung gehabt hat, betont aber außerdem, daß das Füttern selbst, das mittels Magensonde geschieht, die Tiere stark ängstigt und Veranlassung zu Änderungen des Blutdrucks gibt, die sicherlich von großer Bedeutung für die Entstehung der Arteriosklerose sind.

Was Wacker und Huecks Fütterungsversuche betrifft, bei denen die Tiere Cholesterin in Hafer gemischt erhielten und bei denen sämtliche Tiere Arteriosklerose bekamen, so meint Knack, daß die Ursache der krankhaften Veränderungen in kleineren, unbeachtet gebliebenen Infektionen zu suchen sei, die die primäre Schädigung der Aortaintima herbeigeführt hätten.

Ob Knacks Behauptungen Fug für sich haben, ist schwer zu entscheiden, doch ist darauf hinzuweisen, daß seine eigenen Fütterungsversuche mit reinem Cholesterin kritisch durchaus nicht einwandfrei sind. Er verfüttert das Cholesterin zusammen mit Brot, und die Tiere erhalten im übrigen Grünfutter, Knack hat aber nie gezeigt, daß Cholesterin, auf diese Weise verabreicht, resorbiert wird. Bang[1]) fand, daß Hunde, die mit Cholesterin, zusammen mit Fleisch verabreicht, gefüttert wurden, keine Steigerung des Cholesteringehalts im Blute zeigten, daß aber eine solche Steigerung auftrat, wenn die Tiere dieselbe Cholesterinmenge zusammen mit Fett erhielten. Somit ist es wohl wahrscheinlich, daß bei Anitschkows Versuchen dank dem Umstande, daß das Cholesterin den Tieren zusammen mit Öl zugeführt wurde, eine gute Resorption des Cholesterins eintrat. Auch in Wacker und Huecks Untersuchung kann das Fett in der übrigen Nahrung vielleicht eine Rolle gespielt haben; er fütterte die Tiere mit Hafer, welche Getreideart bekanntlich 5—6% Fett enthält.

Sind somit von menschlichen Organen die Nebennieren von verschiedenen Forschern betreffs des Gehalts und Vorkommens von Cholesterin und Cholesterinestern studiert worden, so sind die Untersuchungen in dieser Hinsicht sehr gering an Zahl, was andere Organe betrifft. Windaus' quantitative chemische Untersuchungen über den Gehalt von freiem und gebundenem Cholesterin in normalen Nieren und Amyloidnieren sind bereits oben erwähnt worden. Lapworth[2]) hat in einer Arbeit eine ähnliche Untersuchung über den Cholesteringehalt zweier Nieren veröffentlicht, von denen die eine einem Fall von chronischer, die andere von einem Fall von subakuter parenchymatöser Nephritis entstammte. Er fand einen Gehalt von 0,32% bzw. 0,33% freiem und von 0,18% bzw. 0,25% als Ester gebundenem Cholesterin.

Betreffs des Cholesteringehalts der Leber ist meines Wissens nur eine Untersuchung veröffentlicht worden, nämlich von Landau und McNee[3]), und die Werte, die in dieser Arbeit vorgelegt werden, wechseln derart in

[1]) Diese Zeitschr. **91**, 122, 1918.
[2]) Journ. of Patholog. and Bacteriolog. **15**, 254. 1911.
[3]) Zieglers Beiträge z. allg. Path. u. pathol. Anat. **58**, 667. 1914.

Digitized by Google

den verschiedenen Fällen, daß Landau und McNee selbst sagen, nur in einer einzigen Hinsicht finde sich ein gewisses gesetzmäßiges Verhalten, nämlich darin, daß der totale Cholesteringehalt in einem gewissen Parallelismus zu dem allgemeinen Fettgehalt des Organs steht.

Ich habe mir daher gedacht, daß es der Mühe wert sein könnte, eine Untersuchung über das Vorkommen des Cholesterins und seiner Ester in normalen und krankhaften Organen auszuführen, vor allem, wenn gleichzeitig mit quantitativen chemischen Bestimmungen des Gehalts der Organe an diesen Stoffen die Cholesterinester morphologischen, mikrochemischen Untersuchungen unterzogen würden — das freie Cholesterin läßt sich nämlich kaum morphologisch untersuchen, da es selten in solcher Form in den Geweben vorkommt, daß es mit den gewöhnlichen mikrochemischen Hilfsmitteln erfaßt werden kann.

Als ich an meine Untersuchungen heranging, hatte ich zunächst gedacht, für meine chemischen Bestimmungen dasselbe Verfahren wie Thaysen[1]) zu benutzen. Indessen zeigte es sich im Laufe der Arbeit, daß sein Verfahren zur Extrahierung des Cholesterins und der Cholesterinester aus Organen nicht so gut war, wie man wünschen konnte, weshalb ich gezwungen war, eine beträchtliche Zeit auf methodologische Studien und Untersuchungen zu verwenden.

Bei meinen chemischen Bestimmungen habe ich mich auf Leber, Nieren und Nebennieren beschränkt, die Organe, bei denen man vor allem erwarten konnte, während krankhafter Zustände Abweichungen vom Normalen zu finden. Die Organe, die ich untersucht habe, stammten teils von Personen her, die ohne vorhergehende Krankheit, durch Unfall oder Selbstmord, teils von Personen, die nach vorhergehender längerer oder kürzerer Krankheit gestorben waren. Unter den Krankheiten, bei denen man vor allem eine Veränderung des Cholesteringehalts der Organe zu erwarten hätte, nehmen die Nierenkrankheiten einen hervorragenden Platz ein, und daher gehört ein größerer Teil meiner Fälle eben dieser Krankheitsgruppe an. Ferner habe ich je 2 Fälle von Diabetes, Lebercirrhose und perniziöser Anämie sowie einen Fall von Sublimatvergiftung untersucht.

Bei meinen morphologischen Untersuchungen der Organe von den oben angegebenen Fällen her habe ich das Hauptgewicht

[1]) Diese Zeitschr. 62, 89. 1914.

Digitized by Google

darauf gelegt, das Auftreten und die Lokalisation der Cholesterinester in den Geweben zu beobachten, und habe mich nicht darauf eingelassen, die feineren Zellveränderungen hierbei zu studieren.

Das Ziel für meine Untersuchungen ist gewesen, das Vorhandensein eventueller Veränderungen im Cholesterin- und Cholesterinestergehalt der Organe zu konstatieren, sowie die Möglichkeit einer morphologischen Schätzung dieses Cholesterinestergehaltes festzustellen.

Die Anregung zu vorliegender Arbeit habe ich von Herrn Professor Einar Sjövall, Lund, erhalten, und es ist mir eine angenehme Pflicht, ihm hierfür wie auch für die Hilfe, die ich beim Sammeln von Material für meine Untersuchungen von ihm erfuhr, meinen herzlichen Dank auszusprechen. Herrn Professor Ivar Bang gegenüber, dessen Tod zu Ende des vorvorigen Jahres sowohl seine persönlichen Freunde als auch die Wissenschaft, in deren Dienst er gearbeitet, als ein schwerer Verlust traf, stehe ich in der größten Dankesschuld. Seine Anleitung und seine Hilfe waren es, dank denen es mir gelang, meine chemischen Untersuchungen zu Ende zu führen, und ist es mir vergönnt gewesen, zur Erweiterung unserer Kenntnisse von diesem der Lipoidengruppe, deren Studium ihn besonders interessierte, angehörigen Stoffe in etwas beizutragen, so ist es durchaus sein Verdienst. Mein Dank dafür erreicht ihn nicht mehr, auch nicht mein Dank für das große Interesse, das er meinen Untersuchungen entgegenbrachte. Endlich erlaube ich mir, dem Vorstand des Pathologischen Instituts in Lund, Herrn Professor J. Forssmann, meinem Chef seit mehreren Jahren, meine aufrichtigste Dankbarkeit für die freundliche, nie ermüdende Hilfe, die mir von seiner Seite stets zuteil geworden, für die guten Ratschläge, die er mir gegeben, und für das Interesse, mit dem er meine Arbeit begleitet hat, zu bezeigen.

II. Methodologische Studien.

Kritische Prüfung zuvor angewandter Bestimmungsmethoden.

Gilt es, in tierischen Geweben oder damit vergleichbaren Produkten quantitativ den Gehalt an Cholesterin und Cholesterinestern zu bestimmen, so muß man teils eine Bestimmungsmethode besitzen, die, wenn diese Stoffe in reinem Zustande vorkommen,

Digitized by Google

wissenschaftliche exakte Werte liefert, teils eine Extraktionsmethode, die diese Stoffe quantitativ aus den Geweben freimacht, und zwar in einer solchen Form, daß sie mittels der fraglichen Bestimmungsmethode erfaßt werden können.

Von diesen mehr allgemeinen Gesichtpunkten ausgehend, will ich im folgenden sowohl die Methoden, die bei früheren Untersuchungen angewandt worden, als das von mir verwendete Verfahren prüfen. Um eine bessere Übersicht zu erhalten, will ich hierbei zuerst die direkten Bestimmungsmethoden selbst untersuchen und dann im Zusammenhang mit dem Bericht über das von mir angewandte Verfahren die verschiedenen Methoden, die zuvor benutzt worden sind, um die fraglichen Stoffe aus den Geweben oder Flüssigkeiten, die untersucht wurden, zu isolieren. Es ist indessen klar, daß diese beiden Gesichtspunkte nicht immer auseinander gehalten werden können, sondern dann und wann gleichzeitig berücksichtigt werden müssen, teils um nicht die Darstellung unnötig in die Länge zu ziehen, teils um Wiederholungen zu vermeiden.

Von älteren quantitativen Methoden auf diesem Gebiete seien die erwähnt, welche von Schulze und Barbieri[1]) und Obermüller[2]) ausgearbeitet worden sind, doch kommt ihnen heute kaum mehr als historisches Interesse zu. Es waren erst Hoppe-Seyler[3]) und später Ritter[4]), denen es gelang, zuverlässigere Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins zu finden. Beide Methoden gründeten sich auf die Eigenschaft des Cholesterins, nicht von Alkali beeinflußt zu werden. Das Cholesterin, das aus den zu untersuchenden Produkten zusammen mit Fett und anderen Lipoiden extrahiert wurde bleibt, wenn die Mischung dieser Stoffe mit alkoholhaltiger Natron- oder Kalilauge behandelt wird, unverändert, während das Fett und die übrigen Lipoide verseift werden. Gemäß der Hoppe-Seylerschen Methode wird die Cholesterinmenge nach der Verseifung entweder durch direkte Wägung des in Äther löslichen, nicht verseifbaren Rückstandes oder, nachdem dieser in Alkohol gelöst worden, durch Wägung des auskrystallisierten reinen Cholesterins bestimmt.

Ritter dagegen löst den nicht verseifbaren Rückstand in einer bestimmten Menge Alkohol, worauf er ein gleich großes Volumen Wasser hinzusetzt. Hierbei fällt das Cholesterin als ein feiner weißer Niederschlag aus, da es in 50 proz. Spiritus schwerlöslich ist. Das ausgefällte Cholesterin wird auf ein Filter gesammelt und gewogen.

---

[1]) Journ. f. prakt. Chem. **25**, 159. 1882.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **15**, 37. 1891. **16**. 142. 1892.
[3]) Lehrbuch der physiol.-chem. Analyse 1903.
[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **34**, 430. 1901—1902.

Digitized by Google

Nach der Hoppe-Seylerschen Methode erhält man, wenn das Cholesterin durch direkte Wägung des unverseifbaren Rückstandes bestimmt wird, ein unrichtiges Resultat dadurch, daß Verunreinigungen in Form von Seifen und Glycerin sicherlich nicht vermieden werden können; andererseits geht ein Teil des Cholesterins dadurch verloren, daß es in der Mutterlösung zurückbleibt, wenn es durch Lösung in Alkohol und Auskrystallisierung aus demselben gereinigt wird.

Ritters Verfahren dagegen liefert ein von Seifen und Glycerin freies Substrat, und die Cholesterinmenge, die in dem 50 proz. Alkohol zurückgehalten wird, ist sicherlich minimal. Indessen haftet diesen beiden Methoden ein gemeinsamer Fehler an, nämlich die mangelhafte Verseifung der Cholesterinester. Diese lassen sich, wie Kossel und Obermüller[1]) gezeigt haben, vollständig nur durch Einwirkung von Kalium- oder Natriumalkoholat verseifen, während hingegen die Verseifung bei Verwendung alkoholhaltiger Natron- oder Kalilauge mehr oder weniger unvollständig bleibt. Bei Anwendung der beiden obengenannten Methoden erhält man sicherlich nur eine unvollständige Verseifung der Cholesterinester, und diese gehen so unzersetzt in größerer oder geringerer Menge in die unverseifbare Substanz ein.

Keine von den bisher angeführten Methoden hat indessen die Forscher zufriedenstellen können, die während des letzten Jahrzehnts in immer größerer Anzahl sich dem Studium der Rolle des Cholesterins innerhalb des Organismus gewidmet haben, sondern ständig sind neue Methoden ausgearbeitet worden. 1908 veröffentlichte Iscovesco[2]) eine colorimetrische Methode, 1910 Windaus[3]) seine Digitoninmethode, im selben Jahre Grigaut[4]) eine colorimetrische Methode zur Bestimmung von Cholesterin in kleineren Mengen Blut oder Serum. Im folgenden Jahre teilte Grigaut[5]) eine weitere Methode mit, und zwar für größere Mengen tierischer Flüssigkeiten und Gewebe, wobei das Cholesterin durch direkte Wägung bestimmt wurde. Danach kam 1913 eine Methode von Autenrieth und Funk[6]), die ihrem Prinzip nach vollständig mit der Grigautschen übereinstimmt. Ferner haben Bloor und Knudson[7]) u. a. Forscher mit Methoden gearbeitet, die eine Kombination der Windausschen Digitoninmethode mit einer colorimetrischen darstellen.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **14**, 559. 1890.
[2]) Compt. rend. de la soc. de biol. 1908.
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **65**, 110. 1910.
[4]) Compt. rend. de la soc. de biol. 7. V., S. 791; 14. V., S. 827. 1910.
[5]) Compt. rend. de la soc. de biol. 18. XI., S. 441. 1911.
[6]) Münch. med. Wochenschr. **23**, 1243. 1913.
[7]) Journ. of Biolog. Chem. **27**, 107. 1916.

Digitized by Google

Da eine große Menge Untersuchungen mit diesen verschiedenen Methoden, vor allem mit den colorimetrischen, ausgeführt worden sind, verdienen diese sehr wohl eine eingehende Prüfung. Indessen will ich zuerst näher auf die Methode eingehen, nach welcher ich meine quantitativen chemischen Untersuchungen ausgeführt habe, nämlich die Windaussche Digitoninmethode, die von den meisten übrigen die für meine Arbeit notwendige Eigenschaft voraus hatte, daß sie die Bestimmung von Cholesterin und Cholesterinestern je für sich als freies und als gebundenes Cholesterin ermöglichte; danach werde ich an die Prüfung der übrigen Methoden herangehen.

Windaus gründete seine Methode auf die von ihm gemachte Entdeckung, daß das Cholesterin, nicht aber die Cholesterinester, mit Digitonin und mehreren anderen Saponinen eine beständige, in Alkohol sehr schwerlösliche Verbindung eingeht, die in Äther, Petroleumäther, Chloroform und anderen fettlösenden Stoffen unlöslich ist.

Betreffs der chemischen Konstitution und Eigenschaften des Digitonins verweise ich auf Windaus' Aufsatz darüber im Biochem. Handlexikon. Erwähnt sei hier jedoch, daß seine chemische Formel $C_{55}H_{94}O_{28}$ ist. Es löst sich mit Schwierigkeit in kaltem, ziemlich leicht aber in warmem Wasser zu einer milchigen Flüssigkeit. In warmem Alkohol löst es sich leicht, ist dagegen unlöslich in Äther, Chloroform, Petroleumäther usw. Seine Verbindung mit Cholesterin, das Digitonincholesterid, ist nach Windaus als ein Additionsprodukt aufzufassen und nicht als ein Ester, weshalb dessen chemische Formel am ehesten dieser entsprechen würde: $C_{55}H_{94}O_{28} + C_{27}H_{46}O$. Das Digitonincholesterid ist beständig sowohl in Alkohol als in Äther, Chloroform und Petroleumäther, dagegen wird es von kochendem Xylol langsam zersetzt. In kaltem Wasser löst sich das Digitonincholesterid höchst unbedeutend, besser aber in warmem Wasser, wobei sich eine opalisierende Lösung bildet.

Die von Windaus ausgearbeitete Methode war der Hauptsache nach folgende: Nachdem die zur Untersuchung angewandten Organe mit Äther oder Petroleumäther extrahiert worden — auf die Behandlung der Organe selbst und das Extraktionsverfahren komme ich im Zusammenhang mit der Prüfung der gebräuchlichen Extraktionsmethoden zu sprechen —, wird der Äther zum Verdunsten gebracht und der Cholesterin und Cholesterinester in Mischung mit Fett und Lipoiden enthaltende Rückstand in kochendem Alkohol gelöst. Die Lösung wird warm filtriert, wonach eine 1 proz. Lösung von Digitonin in warmem 90 proz. Alkohol so lange hinzugesetzt wird, als sich Niederschlag bildet. Nach mehreren Stunden wird die Fällung auf ein Filter gesammelt, mit Alkohol und Äther gewaschen, bei 100° getrocknet und gewogen. Die Menge in dem Digitonincholesterid wird nach der Formel berechnet: Cholesterin = Digitonincholesterid · $\frac{386{,}35}{1589{,}06}$ = Digitonincholesterid · 0,2431, wo die Zahl 386,35 das Molekular-

Digitized by Google

gewicht des Cholesterins, 1589,06 das des Digitonincholesterids ist. Der Bequemlichkeit wegen schlägt Windaus vor, nur die für das Digitonincholesterid erhaltene Zahl durch 4 zu dividieren. Das Filtrat von der Digitoninfällung wird sodann zu größerer Konzentration eingedampft und, nachdem Wasser hinzugesetzt worden, mit Petroleumäther oder gewöhnlichem Äther geschüttelt. Hierbei bleibt das überschüssige Digitonin in dem mit Wasser verdünnten Alkohol zurück, während Cholesterinester, Fett und andere Lipoide in den Petroleumäther bzw. Äther übergehen. Nach Abdunsten des Lösungsmittels wird der Rückstand mit Natriumalkoholat in Wärme verseift. Das hierbei freigemachte Cholesterin wird aus der gebildeten Seifenlösung mit Petroleumäther oder Äther extrahiert, worauf es auf die oben angegebene Weise durch Ausfällung mit Digitonin in einer Alkohollösung bestimmt wird.

Windaus' Methode ist nur in großen Zügen von ihrem Urheber beschrieben worden, eine eingehende und genaue kritische Prüfung derselben ist aber später von Thaysen[1]) ausgeführt worden; bereits zuvor war jedoch die Methode von Fraser und Gardner[2]) geprüft worden. Es ist Thaysens großes Verdienst, die Fehlerquellen nachgewiesen zu haben, die dadurch entstehen können, daß das Digitonincholesterid nicht ganz unlöslich in Alkohol ist. Nach Windaus löst sich die 4 mg Cholesterin entsprechende Menge Digitonincholesterid in 100 ccm 95 proz. Alkohol bei 18° C. Windaus aber glaubte diese Fehlerquelle dadurch vermeiden zu können, daß er den für das Digitonincholesterid gefundenen Wert mit 0,25 anstatt mit 0,2431 multiplizierte. Indessen versteht man ohne weiteres, daß dies ein recht willkürliches Verfahren war; es kann, wie ich später zeigen werde, nur angewandt werden, wenn man nicht Digitonin in Überschuß hinzusetzt.

Thaysen führte seine ersten Untersuchungen am reinen Cholesterin aus. Zu einer warmen Lösung von Cholesterin in 95 proz. Alkohol mit bekannten Cholesteringehalt setzte er eine kochende 1 proz. Lösung von Digitonin in 95 proz. Alkohol. Die entstandene Fällung wurde 12—24 Stunden stehengelassen, worauf sie auf ein zuvor abgewogenes und bis zu konstantem Gewicht bei 100° getrocknetes Filter genommen wurde. Die Fällung wurde mit 95 proz. Alkohol und danach mit Äther gewaschen, auf dem Filter bis zu Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen.

Während seiner Arbeit machte Thaysen die Beobachtung, daß, wenn er das Cholesterin mit einer Digitoninmenge fällte,

[1]) Diese Zeitschr. **62**, 89. 1914.

[2]) Proc. of the Roy. Soc. **82**, 559. 1910.

Digitized by Google

die nur eben der Menge des ersteren entsprach, er beim Wägen des gebildeten Digitonincholesterids einen Wert erhielt, der den theoretisch berechneten unterstieg, und daß dem Unterschied zwischen diesen Werten vollkommen der Wert der Menge Digitonincholesterid entsprach, die der Berechnung nach sich in dem Alkohol gelöst hielt. Vermehrte er jedoch die hinzugesetzte Digitoninmenge, so daß ein Überschuß vorhanden war, so wurde der Unterschied zwischen den obengenannten Werten sukzessiv geringer, um bei einem bestimmten Digitoninüberschuß und darüber hinaus vollkommen ausgeglichen zu werden, so daß die berechneten und gefundenen Werte gleich wurden. Thaysen fand also, daß, wenn er mit einem gewissen Minimumüberschuß von Digitonin arbeitete, der in verschiedenen Sendungen von Mercks Digitoninpräparat zwischen 1,5 und 2,5‰ variierte, eine totale Ausfällung von Digitonincholesterid und eine vollkommene Übereinstimmung zwischen den berechneten und gefundenen Cholesterinwerten erhalten wurde. Meines Wissens ist Thaysen der einzige, der beim Arbeiten mit der Windausschen Methode diese sehr wichtigen Verhältnisse beachtet hat. Er hat dadurch der Methode ihre endgültige Form und die Exaktheit gegeben, die die Wissenschaft fordern kann.

Ich führe hier einige von Thaysens Zahlen an, um die Exaktheit der Methode zu beleuchten, wenn reine Cholesterinlösungen angewandt werden.

Angewandtes Cholesterin in mg	Gefundenes Cholesterin in mg
3,4	3,4
3,4	3,5
3,8	3,8
3,8	3,8
4,6	4,5
19,9	19,9
19,9	19,8
21.5	21,5
27,6	27,6

Der Digitoninüberschuß beträgt in allen Fällen mindestens 2‰.

Die einzige Fehlerquelle, die, soweit man sehen kann, möglicherweise der Methode anhaftet, wenn sie an reinen Cholesterinlösungen ausgeführt wird, sind Wägungsfehler, aber diese spielen

Digitized by Google

kaum eine größere Rolle, und die Fehler, die hierdurch eventuell entstehen würden, werden teilweise dadurch reduziert, daß der Wert des Digitonincholesterids nahezu 4 mal so groß ist wie der daraus berechnete Cholesterinwert. Die oben angegebenen Zahlen zeigen, wie gute Resultate die Methode gibt, und sie illustrieren gut, daß die Ausfällung quantitativ ist, wenn Digitonin in Überschuß hinzugesetzt wird. Thaysen gibt nicht an, wie empfindlich die angewandte Reaktion ist, selbst aber habe ich gefunden, daß 0,02 mg Cholesterin in 2 ccm 92 proz. Alkohol versetzt mit 1 ccm 1 proz. Digitoninlösung in 92 proz. Alkohol eine geringe, aber völlig deutliche Fällung nach 12 Stunden ergab. Zur Kontrolle wurden 2 ccm 95 proz. Alkohol mit 1 ccm derselben Digitoninlösung verwendet, und in dem Kontrollröhrchen zeigte die Flüssigkeit keine Spur einer Fällung.

Fraser und Gardner, die vor Thaysen sich der Windausschen Methode bedienten, modifizierten die Methode etwas, um die Fehlerquelle zu vermeiden, daß ein Teil des Digitonincholesterids sich im Alkohol gelöst halten könnte. Sie brachten, nachdem sie das Cholesterin mit Digitonin gefällt hatten, den Alkohol im Vakkum zur Verdunstung. Der Rückstand wurde auf ein Filter gebracht und zuerst mit Äther, danach mit kochendem Wasser gewaschen, um überschüssiges Digitonin zu entfernen. Sie haben drei Versuche mit reinem Cholesterin nach diesem Verfahren ausgeführt und gute Resultate erhalten. Thaysen, der diese Untersuchungen anführt, betont mit Recht, daß die Werte, die sie erhalten, recht problematisch sein dürften, und erwähnt, daß, wenn man auf ein Filter mit Digitonincholesterid Wasser von 50° Temperatur gießt, die abfließende Flüssigkeit stark trübe ist, weshalb kaum ein Zweifel darüber herrschen kann, daß das Wasser einen Teil des Digitonincholesterids löst. Selbst habe ich dieselbe Beobachtung wie Thaysen gemacht und gefunden, daß kochendes Wasser Digitonincholesterid in nicht unbedeutender Menge löst, so daß die Flüssigkeit opalisierend wird.

Wacker und Hueck[1]), die etwas früher als Thaysen eine Arbeit veröffentlichten, in der sie sich der Windausschen Methode bedienten, schlagen vor, zu dem Filtrat nach der Fällung mit Digitonin weitere 10 ccm 1 proz. Digitoninlösung hinzuzusetzen, damit man sicher sein könne, daß alles Cholesterin gefällt worden ist. Sie erreichen hierdurch, vorausgesetzt, daß das Volumen des Filtrats nicht allzu groß ist, dasselbe praktische Resultat wie Thaysen.

Fraser und Gardner hatten in ihrer Arbeit gefunden, daß die Ausfällung von Digitonincholesterin nicht durch die Gegenwart von Neutralfett beeinflußt wurde. Lapworth[2]) konnte das-

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **71**, 373. 1913.

[2]) Journ. of Patholog. and Bacteriolog. **15**, 254. 1911.

Digitized by Google

selbe betreffs Lecithin, Glycerin, freier Fettsäuren und Neutralfett konstatieren. Thaysen bestätigte dies und zeigte, daß das Cholesterin quantitativ bei Gegenwart reichlicher Mengen von freien fetten Säuren, Neutralfett und Phosphatiden gefällt wird.

Nachdem Thaysen diese Verhältnisse mit Lösungen von freiem Cholesterin untersucht hatte, ging er zur Untersuchung der Cholesterinester über. Um diese quantitativ zu bestimmen, ist es notwendig, sie zuerst zu verseifen, so daß das Cholesterin frei wird. Nach Windaus' Vorschrift wandte Thaysen zur Verseifung Natriumalkoholat von ungefähr 5% Stärke an. Windaus führte die Verseifung in Wärme aus, gibt aber nicht die Zeitdauer der Verseifung an. Wacker und Hueck kochten die Cholesterinester mit Natriumalkoholat — 1 g Natrium zu 20 ccm absolutem Alkohol — $^1/_2$—1 Stunde lang. Fraser und Gardner geben gleichfalls nicht die Dauer der Verseifungszeit an. Thaysen unterzog die Frage der Verseifung der Cholesterinester einer näheren Untersuchung, nachdem er konstatiert hatte, daß das Cholesterin selbst nicht von Natriumalkohol beeinflußt wurde. Zuvor hatte Obermüller[1]) nachgewiesen, daß Cholesterin durch 8stündiges Kochen mit normaler alkoholischer Kalilauge keine Beeinflussung erfuhr, und Windaus, daß es nicht durch Behandlung mit Natrium und Äthylalkohol verändert wurde. Thaysen konnte nach 4stündigem Kochen mit 5proz. Natriumalkoholat alles Cholesterin als Digitonincholesterid quantitativ zurückerhalten.

Thaysen setzte zu Lösungen mit bekanntem Gehalt von Cholesterinölsäureester in absolutem Alkohol blankes metallisches Natrium in einer Menge von 1,3 g auf 25 ccm absoluten Alkohol. Die Lösungen wurden auf Wasserbad in einem mit Kühler versehenen Kolben verseift. Die Dauer der Verseifungszeit wurde in den verschiedenen Fällen variiert. Nach dem Abschluß der Verseifung wurde der Alkohol zum Verdunsten gebracht, eine geringe Menge Wasser hinzugesetzt und das freigemachte Cholesterin mit Äther in einem Scheidetrichter extrahiert, worauf es nach Verdunsten des Äthers auf gewöhnliche Weise bestimmt wurde. Hierbei fand Thaysen, daß von den Cholesterinestern gespalten waren

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **16**, 37. 1892.

Digitized by Google

nach 1stündiger Verseifung 71,20%,
„ 2 „ „ 96,55%,
„ 3 „ „ 97,61%,
„ 4 „ „ 99,74%.

Der Gehalt an Cholesterinester war in allen Lösungen ungefähr 1,8‰. In einem späteren Versuch mit einem Cholesterinestergehalt von 0,9‰ war die Verseifung vollständig nach 2 Stunden.

Thaysen führte ferner eine Untersuchung aus, um das Vermögen 20proz. Natronlauge, die Cholesterinester zu verseifen, festzustellen. 24,3 mg Cholesterinölsäureester wurden mit 25 ccm 20proz. Natronlauge 2 Stunden lang verseift. Hierbei wurden nur 3,5% der Ester gespalten. Diesen letzteren Versuch führte Thaysen aus, um Kumagawa und Sutos[1]) Fettbestimmungsmethode zu prüfen, deren Verwendung von diesen auch zur Bestimmung der Cholesterinmenge empfohlen wird. Durch diesen seinen Versuch glaubt Thaysen den Nachweis geführt zu haben, daß die genannte Methode zur Bestimmung des Cholesterins unbrauchbar ist, da die Verseifung so mangelhaft ist.

Thaysens Meinung hat sicherlich viel für sich, trotzdem zahlreiche Forscher auf diesem Gebiete mit Natron- oder Kalilauge verseifen und angeben, daß sie vollständige Verseifung der Cholesterinester erhalten. Selbst habe ich einen Versuch folgendermaßen ausgeführt: 20 ccm 93proz. Alkohol mit 21 mg Cholesterinölsäureester wurden mit 20 ccm 25 proz. NaOH in einem Kolben auf Wasserbad unter Kühler 4 Stunden lang gekocht, worauf das freigemachte Cholesterin auf dieselbe Weise wie in Thaysens Versuch bestimmt wurde. Während des Kochens war die 17,9 mg Cholesterinester entsprechende Cholesterinmenge freigemacht worden, so daß also 85,23% des Cholesterinesters nach 4 Stunden verseift worden waren. Allerdings ist die Verseifung nicht so gut, wie wenn Natriumalkoholat verwendet wird. Daß Thaysen ein so schlechtes Resultat bei seinem Versuch erhielt, dürfte darauf beruhen, daß die Cholesterinester nicht in hinreichend feinverteilter Form vorgekommen sind, sie bilden in der warmen Lauge Fetttropfen, die an die Oberfläche emporsteigen und nur unbedeutend von der umgebenden Lauge angegriffen werden. Sicherlich werden die Bedingungen für die Ver-

[1]) Diese Zeitschr. 8, 212. 1908.

Digitized by Google

seifung besser, wenn, wie in meinem Versuch, Alkohol, der die Ester löst, in der alkalischen Lösung vorhanden ist, oder wenn die Ester auf andere Weise in fein verteiltem Zustand gehalten werden, wie z. B., wenn die Organe in Lauge aufgelöst werden, was bei Kumagawa und Sutos Methode der Fall ist. Aber daß nicht einmal unter diesen Bedingungen eine vollständige Verseifung erhalten wird, zeigen Thaysens Werte auf S. 106 seiner Arbeit, wo nach einem 3—4stündigen Kochen von Organpulver mit 20proz. Natronlauge noch beträchtliche Mengen unveränderter Ester übrig waren.

In Zusammenhang mit diesen Untersuchungen prüft Thaysen die Möglichkeiten, mit Äther das Cholesterin aus einer Seifenlösung zu extrahieren. Er löste genau abgewogene Cholesterinmengen in einer geringen Menge Alkohol oder Äther, worauf 2,5proz. wässerige Lösung von cholesterinfreiem Natriumoleat hinzugesetzt wurde. Danach ließ er den Alkohol bzw. Äther auf Wasserbad verdunsten, und 10 ccm 50proz. Natronlauge wurden hinzugesetzt, um die Lösung stark alkalisch zu machen. Nach Abkühlung wurde die Lösung quantitativ in einen Scheidetrichter übergeführt und mit Äther geschüttelt. Der Scheidetrichter blieb dann 12 Stunden lang stehen, worauf die Seifenlösung abgezapft wurde. Der Äther wurde zuerst mit schwach alkalischem Wasser gewaschen, bis die Seifen aus dem Waschwasser verschwunden waren, so daß, wenn dieses mit HCl angesäuert wurde, die Flüssigkeit nicht die geringste Spur von Opalescenz zeigte, und danach mit destilliertem Wasser, bis dieses nicht mehr nach dem Waschen alkalisch auf Lackmus reagierte. Thaysen extrahierte darauf die abgezapfte Seifenlösung aufs neue mit Äther und wiederholte diese Extraktionen bis zu 5—6 mal. Er fand hierbei, daß die größte Menge Cholesterin in das erste Ätherextrakt, mit 92—94%, und in das zweite, mit 4—5 %, überging. Die letzten Reste von Cholesterin wurden erst in der 4. und 5. Extraktion heraus erhalten.

Indessen war dieses Extraktionsverfahren recht beschwerlich und zeitraubend, weshalb Thaysen eine Modifikation daran vornahm. Nach Verseifung der Cholesterinester wurde der noch warme Alkohol in einen Scheidetrichter hinübergebracht. Der Kolben, in dem die Verseifung geschehen war, wurde mit reichlichen Mengen Äther ausgewaschen, der dann in den Scheide-

Digitized by Google

trichter gegossen wurde. Dieser wurde kräftig geschüttelt, so daß der Alkohol und der Äther gut gemischt wurden, und hiernach wurde gleichviel Wasser hinzugesetzt, wie das Volumen des bei der Verseifung angewandten Alkohols betrug. Der Scheidetrichter wurde 2 Stunden stehen gelassen, worauf die Seifenlösung abpipettiert und der Äther auf oben angegebene Weise gewaschen wurde. Danach wurde dasselbe Verfahren nochmals an der Seifenlösung der ersten Portion des Waschwassers wiederholt. Mittels dieser Technik gelang es Thaysen bereits in der ersten Extraktion etwa 99% des Cholesterins zu erhalten, und die zweite enthielt die unbedeutende Menge, die noch in der Seifenlösung zurückgeblieben war.

Eigene Untersuchungen.

Bestimmung von freiem Cholesterin in einer alkoholischen Lösung.

Als ich meine Untersuchungen begann, führte ich mehrere Serien Bestimmungen von Cholesterin an Lösungen mit bekanntem Gehalt an Cholesterin und Cholesterinölsäureestern aus.

Zu meinen Bestimmungen bediente ich mich des Merckschen Präparats Digitoninum purissimum (Digitalin), das ein vollkommen reines Präparat ist und das alle für das Digitonin charakteristischen Reaktionen gibt. Für das Digitoninpräparat, das ich benutzte, wurde die maximale Fällungsgrenze bei einem Digitoninüberschuß von ungefähr 1,75% erreicht, wie aus nachstehender Tabelle I hervorgeht.

Tabelle I.

Cholesterinmenge in der Lösung in mg	Digitoninüberschuß des Alkoholvolumens in ‰	Alkoholmenge in ccm	Digitonincholesterid in mg	Cholesterin in mg	Unterschied zwischen berechn. und gefundenem Cholesterin in mg
10,0	0,5	13,8	40,6	9,8	0,2
10,0	1,0	14,6	41,0	9,97	0,03
10,0	1,5	15,4	41,0	9,97	0,03
10,0	1,75	15,9	41,1	9,99	0,01
10,0	2,25	16,9	41,2	10,0	—
10,0	2,5	17,5	41,2	10,0	—

Verseifung von Cholesterinestern.

Cholesterinölsäureester wurde synthetisch aus Cholesterin und Ölsäure hergestellt. Er hatte einen Schmelzpunkt zwischen 42 und 45° und zeigte alle physikalischen und chemischen Eigenschaften der Cholesterin-

Digitized by Google

ester; eine alkoholische Lösung desselben gab mit Digitonin keine Fällung. Zur Verseifung wurde zu der in einem Kolben abgemessenen Lösung von Cholesterinölsäureester in absolutem Alkohol noch weiter so viel von dem Lösungsmittel hinzugesetzt, daß das Gesamtvolumen des absoluten Alkohols 25 ccm betrug. In den Kolben wurden nun 1,3—1,4 g blankes metallisches Natrium gelegt, worauf der Kolben rasch unter einen gewöhnlichen Rücklaufkühler gebracht wurde. Bald trat ein heftiges Kochen des Alkohols ein, während die Natriumstücke rasch zusammenschmolzen. Als die Metallstücke ganz verschwunden waren, wurde der Kolben auf ein kochendes Wasserbad gebracht, und der Rücklaufkühler wurde durch ein etwa 60 cm langes Glasrohr von 5—6 mm innerem Durchmesser ersetzt. Die Verseifung auf dem Wasserbade ging 8 Stunden lang vor sich. Danach wurde die warme Seifenlösung direkt in einen Scheidetrichter übergeführt. Der Kolben wurde, mit ungefähr 150 ccm Äther, der in den Scheidetrichter gegossen wurde, ausgewaschen. Nach kräftigem Umschütteln während 3—4 Minuten wurden 25 ccm dest. Wasser hinzugesetzt, worauf der Scheidetrichter mindestens 12 Stunden lang stehengelassen wurde. Die untere, wasserhaltige Flüssigkeitsschicht wurde in einen anderen Scheidetrichter abgelassen, und in diesen wurde auch das Wasser, ungefähr 20 ccm, gebracht, womit der Äther im ersten Scheidetrichter gewaschen worden war. In den anderen Scheidetrichter wurden nun etwa 150 ccm Äther gegossen, danach wurde dieser ein paar Minuten lang kräftig geschüttelt und dann 12 Stunden lang stehengelassen. Hiernach wurde die wasserhaltige Seifenlösung abgelassen, der Äther quantitativ zu dem Äther im ersten Scheidetrichter übergeführt, worauf die gesamte Äthermenge zunächst mit Wasser gewaschen wurde, das durch Zusatz einer geringen Menge Natronlauge alkalisch gemacht worden war, bis die Seifen im Äther verschwunden waren, und dann mit destilliertem Wasser, bis dieses keine Reaktion mehr mit Phenolphthalein gab. Der Äther wurde in einem weithalsigen Kolben zum Verdunsten gebracht. Das hierbei auskrystallisierte Cholesterin wurde durch Zusatz von etwa 10 ccm oder mehr 92 proz. Alkohol und Erhitzen bis zum Sieden gelöst. Zu der warmen Cholesterinlösung wurde kochende 1 proz. Digitoninlösung in 92 proz. Alkohol hinzugesetzt, wobei darauf gesehen wurde, daß der Digitoninüberschuß stets mindestens 2% betrug. Die Fällung wurde 12 Stunden stehengelassen, worauf die Menge Cholesterin auf zuvor angegebene Weise bestimmt wurde.

Das Resultat von vier derartigen Bestimmungen liegt in Tabelle II vor.

Tabelle II.

	Abgemessene Menge Cholesterinölsäureester i. d. Probe in mg	Erhaltenes Digitonincholesterid in mg	Daraus berechnetes Cholesterin in mg	Daraus berechneter Cholesterinester in mg
Versuch 1	25	61,1	14,85	24,94
„ 2	21	51,3	12,47	20,95
„ 3	15	36,6	8,9	14,95
„ 4	10	24,4	5,93	9,96

Digitized by Google

Die Menge Cholesterinölsäureester wurde nach der Formel berechnet $\frac{\text{Cholesterinölsäureester}}{\text{Cholesterin}} = \frac{650{,}62}{386{,}35} = 1{,}68$, wo die Zahl 650,62 das Molekulargewicht des Cholesterinölsäureesters und 386,35 das des Cholesterins ist.

Die in Tabelle II angegebenen Werte zeigen deutlich, teils daß die Verseifung des Cholesterinesters vollständig ist, teils daß das freigemachte Cholesterin sich quantitativ aus der alkoholischen, schwach seifenhaltigen Lösung extrahieren läßt, und bestätigen völlig die von Thaysen gemachten Beobachtungen. Desgleichen kann ich Thaysens Erfahrung bestätigen, daß zwei Ätherextraktionen genügend sind, um eine quantitative Extraktion zu erhalten.

Quantitative Bestimmung von freiem und gebundenem Cholesterin in einer alkoholischen Lösung von Cholesterin und Cholesterinölsäureester.

In einer Alkohollösung mit bekanntem Gehalt von reinem Cholesterin und Cholesterinölsäureester wurde zuerst das freie Cholesterin auf die oben angegebene Weise unter Achtgabe auf genügenden Digitoninüberschuß gefällt. Nachdem die Fällung 12 Stunden stehengelassen worden war, wurde sie quantitativ auf ein zuvor im Wägeglas zu Gewichtskonstanz bei 100° getrocknetes, abgewogenes Papierfilter gesammelt. Die Fällung wurde zuerst mit kaltem 92 proz. Alkohol und danach mit Äther gewaschen. Was das Waschen mit Äther betrifft, so habe ich es auf folgende Weise ausgeführt, was ich erwähne, weil es von großer Wichtigkeit ist, daß das Ätherwaschen sorgfältig vorgenommen wird, besonders wenn die Cholesterinestermengen einigermaßen groß sind. Die Cholesterinester sind schwerlöslich in kaltem Alkohol, und wenn sie nicht in allzu geringer Menge vorkommen, fallen sie beim Abkühlen des Alkohols aus und kommen somit in fester Form in der Digitonincholesteridfällung mit auf das Filter. Daher wurde auf das Abflußrohr des zum Filtrieren verwendeten Glastrichters ein Gummischlauch, der mehrere Tage lang in Äther gelegen hatte, gestreift, und durch Schließen des Gummischlauchs mittels einer Klemme wurde der Äther daran gehindert, beim Waschen rasch durch das Filter zu laufen, und jede zum Waschen angewandte Ätherportion wirkte mehrere Minuten auf die Fällung ein, bevor der Äther in das Filtrat von der Digitoninfällung her abgelassen wurde. Um die Ätherverdunstung zu vermindern, wurde der Trichter mit einem Uhrglas bedeckt, wobei darauf geachtet wurde, daß dieses nirgends die Ränder des Filters be-

Digitized by Google

rührte. Auf diese Weise konnte ich stets durch Waschen mit wiederholten kleinen Ätherportionen, zusammen etwa 50 ccm Äther, eine ordentliche Herauslösung der Cholesterinester erhalten. In den Fällen, wo die Digitonincholesteridfällung sehr groß war, pflegte ich außerdem während des Waschens mit Äther dann und wann in der Fällung mit einem stumpfen Glasstabe herumzurühren; an diesem eventuell sitzenbleibende Reste der Fällung wurden dann sorgfältig in diese hinabgespült. Nachdem die Fällung so gewaschen worden, wurde sie zu Gewichtskonstanz in demselben Wägeglas, das vorher benutzt worden war, getrocknet und gewogen.

Um sodann die Cholesterinester aus dem Filter zu isolieren, bediente ich mich bei meinen ersten Versuchen des von Windaus angegebenen, später von Thaysen etwas modifizierten Verfahrens. Das Filtrat mit dem Äther von der Ätherwaschung der Fällung her wurde so auf Wasserbad auf ungefähr 10 ccm Volumen eingedampft, worauf es, noch warm, in einen Scheidetrichter gegossen wurde; der Kolben, in welchem es sich befunden hatte, wurde wiederholt mit Äther gewaschen, der in den Scheidetrichter gegossen wurde. Die Äthermenge, die ich zur Extraktion anwandte, war etwa 150 ccm. Der Äther und die alkoholhaltige Lösung wurden durch mehrmaliges Umkehren des Scheidetrichters gemischt. Hierbei entstand eine recht beträchtliche Ausfällung von Digitonin, das sich in der Lösung befand, nachdem aber 10—15 ccm dest. Wasser hinzugesetzt worden, löste sich das Digitonin mehr oder weniger wohl, je nach seiner Menge, in der Lösung. Der Scheidetrichter blieb stehen, und die untere Flüssigkeitsschicht wurde nach 12 Stunden in einen anderen Scheidetrichter abgelassen und 150 ccm Äther zu einer zweiten Extraktion hinzugesetzt. Der Äther von den beiden Extraktionen her wurde zusammengegossen, eingedampft, der Rückstand in 25 ccm absolutem Alkohol gelöst, Natrium hinzugesetzt und die Verseifung usw. auf die oben beschriebene Weise ausgeführt.

Dieses Verfahren, die Cholesterinester zu isolieren, das von Thaysen angewandt worden war, fand ich indessen wenig praktisch. Oft löste sich das ausgefällte Digitonin bei der ersten Ätherextraktion unvollständig nach Zusatz von Wasser, und bei der zweiten Ätherextraktion entstand stets eine reichliche Fällung. Das ausgefällte Digitonin sammelte sich an der oberen Fläche

Digitized by Google

der unteren Flüssigkeitsschicht und machte es oft unmöglich, beim Ablassen dieser letzteren die untere Grenzschicht des Äthers unterscheiden zu können. Ich ging daher bald zu einem anderen Verfahren, die Cholesterinester aus der digitoninhaltigen Lösung zu isolieren, über. Das Filtrat nebst dem zum Waschen der Fällung angewandten Alkohol und Äther wurde auf Wasserbad in einem Kolben unter Durchleitung eines Luftstromes eingedampft. Nachdem der Rückstand, aus Digitonin und Cholesterinester bestehend, getrocknet worden, wurde er mit einer reichlichen Menge Äther übergossen, der 12 Stunden lang stehenblieb. Hiernach wurde der Äther in einen neuen Kolben abfiltriert, und nachdem der Bodensatz in dem ersten Kolben eine Weile auf Wasserbad getrocknet worden, wurde eine neue, gleich große Menge Äther hinzugesetzt, die ebenso lange Zeit wie die vorige stehengelassen wurde. Ich habe hierbei konstatieren können, daß diese zwei Ätherextraktionen hinreichend waren, um quantitativ den Cholesterinester herauszulösen. Es geht dies deutlich aus den Werten in Tabelle III hervor, wo ich in allen vier Versuchen das zuletzt beschriebene Verfahren benutzte. Auch bei meinen Untersuchungen an Organen hat sich mir dies bestätigt. Dadurch, daß ich nach diesen zwei Ätherextraktionen noch eine oder zwei weitere Extraktionen ausführte, habe ich nicht mehr Cholesterinester herauslösen können, wenigstens nicht in so großer Menge, daß es hinreichend gewesen wäre, um Liebermann-Burchards Farbenreaktion zu geben.

Tabelle III.

Versuch	In der Probe befand sich		Freies Cholesterin		Gebundenes Cholesterin		
	Cholesterin in mg	Cholesterinölsäureester in mg	Digitonincholesterid in mg	Daraus berechnet Cholesterin in mg	Digitonincholesterid in mg	Daraus berechnet Cholesterin in mg	Daraus berechnet Cholesterinölsäureester in mg
1	20	15	82,2	19,98	36,7	8,92	14,98
2	15	10	61,8	15,02	24,4	5,93	9,96
3	11,5	11	47,2	11,47	26,9	6.54	10,98
4	6,4	9	26,3	6,39	22,0	5,35	8,99

Ich habe, wie diese Tabelle zeigt, völlig akzeptable Werte erhalten, wenn ich mit Lösungen von reinem Cholesterin bzw. Cholesterinölsäureester arbeitete. Die kleinen Fehler, die vorhanden sind, sind hier nicht größer als die, welche man bei jeder

Digitized by Google

chemischen quantitativen Analyse erhalten dürfte, bei der man sich direkter Wägung auf einer gewöhnlichen Präzisionswage bedient. Und da man bei jeder Bestimmung zwei Wägungen auf konstantes Gewicht, teils des Filtrats allein, teils dieses und der Fällung, auszuführen hat, so ist es möglich, daß ein Fehler von $\pm$ 0,1 mg jedesmal sich einschleichen kann, und daß demnach schlimmstenfalls ein Fehlwert von 0,2 mg Digitoninchloesterid, entsprechend $\pm$ 0,048 mg Cholesterin, entstehen kann. Die Methode ist indessen, von diesen Möglichkeiten einer Fehlbestimmung abgesehen, völlig zuverlässig.

Colorimetrische Methoden.

Wenn ich bei meinen Untersuchungen mich der Windausschen, von Thaysen später ausgearbeiteten Methode bediente, so war der Grund hiervon, wie ich bereits oben hervorgehoben, der, daß diese Methode die einzige ist, mittels der man das freie und das als Ester gebundene Cholesterin je für sich bestimmen kann. Indessen habe ich, um mir eine Vorstellung davon zu bilden, wie zuverlässig die Untersuchungen sind, welche mit den in zahlreichen Arbeiten angewandten colorimetrischen Methoden ausgeführt worden sind, auch dieses Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins geprüft. Das Prinzip bei allen diesen ziemlich gleichartigen colorimetrischen Methoden besteht darin, daß an einem cholesterinhaltigen Ausgangsmaterial eine der Farbenreaktionen des Cholesterins ausgeführt und dann die Farbenstärke der Probe mit der Farbenstärke verglichen wird, die eine bestimmte Menge auf dieselbe Weise behandeltes Cholesterin gibt.

Schon Burchard[1]) versuchte die von ihm modifizierte Liebermannsche Cholestalreaktion zu quantitativer Bestimmung des Cholesterins anzuwenden, es gelang ihm aber nicht, zuverlässige Werte zu erhalten. Iscovesco bediente sich der sehr empfindlichen Tschugajeffschen Reaktion zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins. Indessen ist seine Methode zu keiner ausgedehnteren Anwendung gekommen, was teils darauf beruht, daß die Reaktion selbst schwer in hinreichend genauer Weise auszuführen ist, teils darauf, daß diese Reaktion sehr empfindlich gegen eventuelle Verunreinigungen ist. Selbst habe ich keine quantitativen Bestimmungen nach dieser Methode ausgeführt, aber Defaye[2]), Henes[3]),

[1]) Beitrag zur Kenntnis des Cholesterins. Rostock 1883.

[2]) Contributions à l'étude clinique de la cholestérinémie. Bordeaux 1912. Nur in Referat.

[3]) Dtsch. Archiv f. klin. Med. **111**, 122. 1913.

Digitized by Google

Thaysen u. a. Autoren betonen mit Bestimmtheit die großen Mängel dieser Methode.

Grigaut dagegen bediente sich der Liebermann-Burchardschen Reaktion zur quantitativen Bestimmung des Gesamtcholesterins in Serum und Blut, und sein Verfahren ist später unbedeutend von Autenrieth und Funk sowie von Bloor und Knudson modifiziert worden.

Grigauts Methode ist folgende: Nachdem das Cholesterin mit Äther aus beispielsweise 2 ccm mit Alkali behandeltem Blut extrahiert worden, wird das Ätherextrakt in Chloroform in einem graduierten Probierröhrchen gelöst. Die zur Lösung verwendete Chloroformmenge sei 5 ccm. Zu dieser Lösung werden nun 2 ccm Essigsäureanhydrid und 3 Tropfen konz. Schwefelsäure hinzugesetzt. Gleichzeitig wird in einem anderen graduierten Probierröhrchen von demselben Lumen wie das erste die gleiche Prozedur an 5 ccm Lösung von reinem Cholesterin in Chloroform mit einem Cholesteringehalt von 0,06 g auf 100 ccm Chloroform durchgeführt. Die beiden Röhrchen bleiben eine halbe Stunde lang stehen, wonach die Farbenstärke in den beiden Röhrchen verglichen wird. Dadurch, daß zu dem Röhrchen, dessen Lösung höhere Farbenstärke zeigt, eine aus Chloroform, Essigsäureanhydrid und konz. Schwefelsäure in denselben Proportionen wie den bei der Reaktion angewandten bestehende Lösung hinzugesetzt wird, kann man dieselbe Farbenstärke in beiden Röhrchen erhalten. Da man die Cholesterinmenge in dem einen Röhrchen und die Flüssigkeitsmenge, die man in dem anderen Röhrchen hinzugesetzt hat, kennt, so kann man die Menge Cholesterin in dem anderen Röhrchen berechnen.

Autenrieth und Funk bestimmen das Gesamtcholesterin im Serum nach der Extraktion auf dieselbe Weise wie Grigaut, mit dem Unterschied jedoch, daß sie hierbei ihr allgemein bekanntes Colorimeter benutzen und in dem Vergleichungskeil eine haltbare Farblösung von derselben grünen Farbe wie die haben, welche das Cholesterin bei der Liebermann-Burchardschen Farbenreaktion gibt.

Bloor und Knudsen bestimmen das Gesamtcholesterin im Serum nach Autenrieth und Funk und das als Ester gebundene nach derselben Methode, nachdem zuerst das freie Cholesterin mit Digitonin gefällt worden ist.

Um die Zuverlässigkeit der colorimetrischen Methoden festzustellen, habe ich einige Bestimmungen nach Autenrieth und Funks Methode an reinem Cholesterin ausgeführt und mich ihres gewöhnlichen Colorimeters bedient. Nach der Vorschrift dieser Autoren wurde das zur Untersuchung verwendete Cholesterin (Mercksches Präparat) in 5 ccm Chloroform gelöst. Zu der Chloroformlösung wurden 2 ccm Essigsäureanhydrid und 0,1 ccm konz. Schwefelsäure hinzugesetzt. Das Röhrchen mit der Lösung wurde hiernach im Dunkelzimmer in ein Wasserbad von 32—35° C gesetzt und blieb dort 15 Minuten lang stehen, wobei eine je auch dem Cholesteringehalt mehr oder weniger

Digitized by Google

kräftig grüne Farblösung erhalten wurde. Danach geschah die Ablesung der Farbenstärke. Ich bediente mich dabei teils eines zum Apparat gehörigen Vergleichungskeils aus Glas, gefüllt mit einer Farblösung, die für jede Bestimmung dadurch erhalten wurde, daß die oben beschriebene Farbenreaktion an einer bekannten Cholesterinlösung ausgeführt wurde, teils des von Autenrieth-Funk angewandten, mit einer haltbaren grünen Farblösung gefüllten Glaskeils. Dieser letztere Vergleichungskeil wurde von der Firma F. Hellig & Co. in Freiburg bezogen; ihm beigegeben war eine sog. Eichungskurve, mit deren Hilfe man die Werte des Colorimeters direkt in Milligramm Cholesterin, berechnet auf die angestellte Probe, erhalten konnte.

Bei diesen Untersuchungen habe ich konstatieren können, daß, auch wenn man die Farbenreaktion vollkommen nach Autenrieth-Funks Vorschriften und unter Beobachtung aller Kontrollvorschriften betreffs Reagens und Probierröhrchen ausführt, man doch, trotzdem die Reaktion an reinem Cholesterin vorgenommen wird, sehr oft verschiedene Nuancen der grünen Farbe erhält. Meistens gesellt sich zu der grünen Farbe ein schmutzigbrauner oder braungelber Farbenton statt der reinen, klaren, grünen Farbe, und diese Mißfärbung erschwert in hohem Grade die Ablesung der Farbenstärke, ja, bisweilen macht sie eine zuverlässige Ablesung ganz unmöglich. Die Mißfärbung tritt nicht immer deutlich hervor, wenn man die Farbflüssigkeit in dickerer Schicht sieht, sondern oft erst in dünneren Schichten, wie sie bei der Ablesung verwendet werden. Worauf die Mißfärbung beruht, weiß ich nicht, und ich habe auch nicht versucht, die Ursache festzustellen. Autenrieth-Funk wie auch Bloor u. a., die dasselbe beobachtet haben, gaben an, die Mißfärbung beruhe darauf, daß in den Ätherextrakten, an denen sie ihre Bestimmungen ausführten, irgendeine Verunreinigung vorhanden war, die eine andere Farbe als Grün bei der angewandten Farbenreaktion gab. Diese Erklärung kann natürlich nicht zutreffend sein, da es sich zeigt, daß dieselbe Erscheinung auftritt, auch wenn man reines Cholesterin benutzt. Autenrieth und Funk schreiben vor, daß man, wenn die Farben in der Probe und in dem Vergleichungskeil nicht identisch sind, sich statt dessen nach der Lichtstärke zu richten hat, wer aber auch noch so wenig mit colorimetrischen Bestimmungen gearbeitet hat,

Digitized by Google

weiß, wie schwer es ist, zu einem zuverlässigen Resultat zu kommen, wenn die zu vergleichenden Farben nicht identisch sind.

Mueller[1]), der in einer Arbeit verschiedene Bestimmungsmethoden vergleicht, führt vier Bestimmungen an reinem Cholesterin nach Autenrieth-Funks Methode an.

Er findet 0,56 mg, wenn die Menge 0,6 mg war,
1,78 „ „ „ „ 1,8 „ „
2,41 „ „ „ „ 2,4 „ „
0,86 „ „ „ „ 1,08 „ „

Wie man sieht, gute Werte außer dem letzten, wo Mueller eine andere Farbennuance als die gewöhnliche erhielt, was jedoch seiner Meinung nach seltener eintrifft.

In Tabelle IV sind die Werte angeführt, die ich bei Anwendung von Autenrieth-Funks Vergleichungskeil mit haltbarer Farblösung erhalten habe. Die Werte in Tabelle V resultierten bei Verwendung eines Glaskeils, gefüllt mit einer Farblösung, die ich dadurch erhalten hatte, daß ich die Liebermann-Burchardsche Reaktion an einer Chloroformlösung mit bekanntem Cholesteringehalt ausführte.

Tabelle IV.

Wirkliche Cholesterinmenge in mg	Gefundene Cholesterinmenge in mg	Bestimmungsfehler in %
0,50	0,52	+ 4
0,50	0,54	+ 8
0,50	0,53	+ 6
0,50	0,56	+ 12
0,4	0,44	+ 10
0,4	0,44	+ 10
0,36	0,37	+ 2,8
0,36	0,38	+ 5,5
0,32	0,31	− 3,1
0,32	0,31	− 3,1
0,30	0,37	+ 23,3
0,30	0,28	− 6,6
0,30	0,35	+ 16,6
0,28	0,25	− 10,7
0,28	0,25	− 10,7
0,24	0,22	− 8,3
0,24	0,26	+ 8,3
0,20	0,17	− 15
0,20	0,17	− 15
0,20	0,17	− 15
0,20	0,16	− 18

[1]) Journ. of Biolog. Chem. 25, 549. 1916.

Digitized by Google

Tabelle V.

In dem Vergleichungskeil eine Farbflüssigkeit, erhalten durch Farbenreaktion an einer Lösung von 5 mg Cholesterin, gelöst in 5 ccm Chloroform.

Wirkliche Cholesterinmenge in mg	Gefundene Cholesterinmenge in mg	Bestimmungsfehler in %
1	1,1	+ 10
0,8	1,1	+ 37,5
0,5	0,75	+ 50
0,2	0,15	— 25

In dem Vergleichungskeil eine Farbflüssigkeit, erhalten durch Farbenreaktion an einer Lösung von 1 mg Cholesterin in 5 ccm Chloroform.

mg	mg	%
0,5	0,43	— 14
0,4	0,28	— 30
0,3	0,25	— 16
0,2	0,16	— 20
0,1	0,09	— 10

Aus den Zahlen in Tabelle IV und V scheint hervorzugehen, daß man bessere Werte erhält, wenn man einen Vergleichungskeil mit einer konstanten, haltbaren Flüssigkeit anwendet, als wenn man jedesmal sich eine Farbflüssigkeit zum Vergleich dadurch beschafft, daß man die Farbenreaktion an einer Lösung von bekanntem Cholesteringehalt ausführt. Die auftretenden Bestimmungsfehler sind indessen recht groß, und diese colorimetrische Methode kann sich an Genauigkeit nicht mit der Digitoninmethode messen, mit welcher man an reinen Cholesterinlösungen Werte erhält, die so gut wie identisch mit den wirklichen Werten sind. Ich verweise auf meine vorhergehenden Tabellen. Was die Anwendung dieser colorimetrischen Methode bei Bestimmung der Cholesterinmenge in Extrakt aus Serum oder Geweben betrifft, so ist es wohl kaum wahrscheinlich, daß sie hierbei bessere Werte gibt, sondern eher schlechtere, da man die Möglichkeit nicht ausschließen kann, daß das Extrakt Verunreinigungen enthält, die auf die Reaktion und die dabei erhaltene Farbe einwirken.

Wie es sich mit anderen colorimetrischen Methoden verhält, darüber kann ich mich nicht äußern, da ich sie nicht geprüft habe, doch dürfte für die Grigautsche Methode dasselbe gelten wie für die Autenrieth-Funksche. da sie beide auf dieselbe Farbenreaktion gegründet sind.

Außer diesen obenerwähnten colorimetrischen Methoden wurde 1916 eine neue von Weston[1]) veröffentlicht. Leider ist es mir nicht gelungen, die betreffende Arbeit im Original zu erhalten, und ich kann mich nicht darüber äußern, ob seine Methode, die sich auf die Salkowskische Farbenreaktion gründet, besser oder schlechter ist als die übrigen. In einer Arbeit von Feigl[2]), in der er unter anderem den Gesamtcholesteringehalt in Sera

[1]) Journ. of Biolog. Chem. 1916.

[2]) Diese Zeitschr. **90**, 173. 1918.

Digitized by Google

von Diabetes mellitus her untersucht, findet man Paralleluntersuchungen nach verschiedenen Methoden. Er wendet so Bloors[1]), Autenrieth-Funks und Westons Methode an. Von diesen Untersuchungen zeigen diejenigen, die mit der Autenrieth-Funkschen und der Westonschen Methode ausgeführt worden, Werte, die höchst unbedeutend variieren, während dagegen die nach der Bloorschen Methode erhaltenen Werte bedeutend höher sind.

Ich führe hier die sechs ersten Bestimmungen aus seiner Tabelle auf S. 206 an.

	Cholesterin in mg		
	nach Bloor	nach Autenrieth-Funk	nach Weston
1.	310	220	230
2.	340	290	300
3.	420	380	370
4.	400	360	370
5.	410	340	350
6.	420	380	370

Weshalb diese verschiedenen Methoden so verschiedene Werte geben, ist schwer zu sagen, möglich ist, daß die Extraktionsweise eine Rolle dabei spielt. Bloor extrahiert das Cholesterin dadurch, daß er das Serum langsam in eine Mischung von 3 Teilen Alkohol und 1 Teil Äther hinablaufen läßt, wonach das Ganze auf Wasserbad gekocht wird. Bei der Autenrieth-Funkschen und der Westonschen Methode wird das Serum mit 25% KOH zerkocht, und danach wird das Cholesterin aus der alkalischen Flüssigkeit in Scheidetrichter extrahiert. Es ist möglich, daß man bei Extraktion mit Alkohol-Äther nach Bloor Verunreinigungen mit bekommt, die auf die Farbenreaktion einwirken. Andererseits geben Autenrieth-Funk an, daß man nach Grigauts Methode bedeutend niedrigere Werte als mit der ihrigen erhält, so z. B. fanden sie in einer Blutprobe nach Grigauts Methode 120—130 mg, wenn aber die Untersuchung nach ihrer eigenen Methode ausgeführt wurde, 190—194 mg; und hierbei ist zu beachten, daß nach beiden Methoden der Extraktion eine eingreifende Behandlung mit Alkali vorhergeht. Autenrieth-Funk erklären die niedrigen Werte, die sie bei Anwendung der Grigautschen Methode erhielten, als auf einer mangelhaften Extraktion beruhend, während Grigaut in seiner Arbeit hervorhebt, daß er bei seinem Verfahren eine quantitative Extraktion von freiem und gebundenem Cholesterin erhält. Ein größerer

[1]) Journ. of Biolog. Chem. **23**, 317. 1915.

Digitized by Google

Unterschied in den Werten auf Grund des Umstandes, daß das Cholesterin als Ester gebunden vorkommt, kann sicherlich nicht entstehen, da auch die Cholesterinester die Liebermann-Burchardsche Reaktion geben, und zwar nach Autenrieth-Funk in einer Stärke, die dem in ihnen enthaltenen Cholesterin entspricht.

Geht man Arbeiten, die diesbezügliche Fragen behandeln, durch, so hält es oft schwer, Resultate, die mit verschiedenen colorimetrischen Methoden erhalten worden sind, miteinander zu vergleichen. Die colorimetrischen Methoden besitzen den Vorteil, daß sie leicht ausführbar sind, sie brauchen nur eine geringe Menge Untersuchungsmaterial, was wichtig ist, wenn man z. B. Blut oder Serum zu wiederholten Malen untersuchen will, es geht ihnen aber hinreichende Genauigkeit ab. Es läßt sich wohl nicht leugnen, daß bei der Beurteilung, ob eine Probe dieselbe Farbenstärke hat wie eine andere, dem Beurteiler ein gewisser Spielraum gelassen wird, die Methode ist nicht hinreichend objektiv. Und der Umstand, daß Untersuchungen, an demselben Material, aber mit verschiedenen colorimetrischen Methoden ausgeführt, so divergierende Werte ergeben können, obwohl sämtliche Methoden von ihren Urhebern und anderen, die mit ihnen gearbeitet haben, als höchst vortrefflich gepriesen werden, dies alles deutet darauf, daß die genannten Methoden keine zuverlässigen absoluten Werte geben, sondern nur relative Werte, die in einer bestimmten Untersuchung dem Untersucher Auskünfte in dieser oder jener Richtung geben können. Will man dagegen zu einer sicheren Auffassung von der wirklichen absoluten Menge Cholesterin, freiem und gebundenem, das in Blut oder Geweben enthalten ist, gelangen, so können diese Methoden nicht zur Verwendung kommen.

Während der Zeit, wo ich bei Prof. Bang im Mediz.-chem. Institut in Lund arbeitete, arbeitete er Mikromethoden zur Bestimmung verschiedener Lipoide im Blut aus, und unter diesen auch solche zur Bestimmung von Cholesterin und Cholesterinestern. Diese Methoden wurden indessen nicht fertig, bevor ich den größten Teil meiner chemischen Untersuchungen abgeschlossen hatte. Ich habe keine Untersuchungen nach Bangs Methode ausgeführt und will nur auf diese seine Arbeiten hinweisen. In mehreren Fällen führte ich Parallelbestimmungen an dem-

Digitized by Google

selben Material wie Prof. Bang aus, wobei recht gut übereinstimmende Werte mit der Makro- und der Mikromethode erhalten wurden; die betreffenden Untersuchungen sind in Prof. Bangs Arbeit (diese Zeitschr., 91, 241) veröffentlicht. Sicherlich werden viele mit Freuden diese Möglichkeit begrüßen, eine leicht ausführbare quantitative Untersuchungsmethode zu erhalten, die exakte Resultate gibt und die auch angewandt werden kann, wenn man nur sehr kleine Mengen Untersuchungsmaterial zur Verfügung hat.

Auf Grund des oben Dargelegten glaube ich behaupten zu können, daß die Windaussche Digitoninmethode, ausgeführt nach Thaysens Vorschriften, sehr wohl den Anforderungen genügt, die man an eine wissenschaftlich exakte Methode stellen kann, wenigstens wenn man das freie Cholesterin und die Cholesterinester rein in einer Lösung hat.

Ich wende mich nun der anderen gleich wichtigen Frage zu: Wie kann man quantitativ das Cholesterin und die Cholesterinester aus den Geweben oder Flüssigkeiten, die man untersuchen will, freimachen, um sie dann quantitativ mittelst der Digitoninmethode bestimmen zu können?

Extraktionsmethoden.

Die quantitative Isolierung des Cholesterins und der Cholesterinester aus Organen oder damit vergleichbaren Substraten ist, wie leicht ersichtlich, eine der Bedingungen dafür, daß es gelingen soll, sie quantitativ zu bestimmen.

Nach älteren Methoden wurden diese Stoffe zusammen mit anderen Lipoiden dadurch isoliert, daß man z. B. getrocknetes und pulverisiertes Organ oder Blut mit den gewöhnlichen Lösungsmitteln, Äther, Alkohol, Chloroform u. a., behandelte. Ich will hier nicht näher auf eine Beschreibung der zahlreichen Methoden die zur Anwendung gekommen sind, eingehen, sondern verweise auf Glikins[1]) und Kumagawa und Sutos Arbeiten, die eine eingehende Darstellung und Prüfung älterer Verfahren bieten.

Kumagawa und Suto[2]) arbeiteten 1908 eine Methode zur Bestimmung von Fett und unverseifbaren Substanzen in Geweben und Blut aus, welche Methode seitdem recht viel angewandt worden und in allen größeren Handbüchern der physiologischen Chemie wiedergegeben ist.

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. **95**, 107. 1903.

[2]) Diese Zeitschr. 8, 212. 1908.

Digitized by Google

Man kann jedoch kaum sagen, daß ihre Methode neu war, denn bereits 10 Jahre früher hatten Liebermann und Szekely[1]) eine Methode veröffentlicht, die sowohl ihrem Prinzip nach wie in mehreren wichtigen Einzelheiten in der Kumagawa-Sutoschen Methode wiederkehrt.

Ich will hier nur ganz summarisch ihr Verfahren erwähnen und verweise im übrigen auf ihre Originalarbeit. Zermahlene Organsubstanz wird mit 20 proz. NaOH 2 Stunden lang gekocht. Die Lösung wird in einen Scheidetrichter übergeführt, um dort abzukühlen, und 20 proz. HCl wird in Überschuß hinzugesetzt, wobei eine reichliche Fällung entsteht. Danach wird in den Scheidetrichter reichlich Äther gegossen, und der Scheidetrichter wird kräftig geschüttelt. Nachdem dieser einige Zeit gestanden hat, trennt sich der Äther von der übrigen Flüssigkeit, und die Fällung verdichtet sich zu einer dünnen Schicht dicht unterhalb des Äthers. Die unterste klare Flüssigkeit wird nun in ein Becherglas abgelassen, und der Äther wird vorsichtig in ein anderes Becherglas abgegossen. Hiernach wird die Fällung in dem Scheidetrichter mit Natronlauge gelöst, die alkalische Lösung wird mit einer neuen Ätherportion geschüttelt und danach in den Scheidetrichter die vorher abgelassene untere wässerige Lösung übergeführt und der Scheidetrichter aufs neue geschüttelt. Nachdem der Äther sich von dem übrigen getrennt hat, wird die untere Flüssigkeitsschicht abgelassen und der Äther zu der ersten Ätherportion hinzugegossen. Die gesamte Äthermenge wird zum Verdunsten gebracht, der Rückstand getrocknet und dann in Petroleumäther gelöst. In diesem finden sich nun in Lösung teils freie fette Säuren und teils nicht verseifbare Substanz, hauptsächlich Cholesterin. Um dieses von den freien fetten Säuren zu trennen, wird zu der Petroleumätherlösung, die in einen Scheidetrichter übergeführt worden, alkalischer absoluter Alkohol mit 1% Gehalt an KOH hinzugesetzt. Hierbei erhält man eine klare Lösung. Wird nun eine gewisse Quantität Wasser hinzugesetzt, so trennen sich die Flüssigkeiten voneinander, und die neugebildeten Seifen lösen sich in dem verdünnten Alkohol, während dagegen das Cholesterin sich in dem Petroleumäther gelöst hält und als unverseifbare Substanz durch Wägung nach dem Verdunsten des Petroleumäthers bestimmt werden kann.

Die Vorteile der Methode sollen nach ihren Urhebern darin bestehen, daß man eine quantitative Extraktion erhält und daß das Cholesterin in einer solchen Form vorliegt, daß es sich dann direkt bestimmen läßt. Ferner kann die Methode direkt auf Organe angewandt werden, ohne daß diese vorher getrocknet zu werden brauchen, wie das bei anderen Verfahren gewöhnlich der Fall ist. Daß das Trocknen eine Rolle spielen kann, haben Shimidzu[2]) und Tamura[3]) gezeigt, sie erhielten nämlich niedrigere Werte sowohl für Fett wie für unverseifbare Substanz, wenn sie getrocknete Organsubstanz untersuchten, als wenn sie dieselbe Untersuchung an demselben Organ frisch, ohne es zu trocknen, unternahmen. Indessen ermangelt

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. **72**, 360. 1898.
[2]) Diese Zeitschr. **28**, 237. 1910.
[3]) Diese Zeitschr. **41**, 78. 1912.

Digitized by Google

diese Methode nicht ihrer Fehler. Thaysen machte zwei Bestimmungen nach dieser Methode, bei der einen folgte er genau den Vorschriften Kumagawa und Sutos, bei der anderen wich er von diesen insofern ab, als er nicht mit HCl ansäuerte, sondern mit Äther direkt aus der alkalischen Lösung extrahierte. Er fand, daß zwei Ätherextraktionen, wie Kumagawa und Suto es vorschreiben, nicht hinreichend waren, um das Cholesterin quantitativ zu extrahieren, sondern er konnte bei wiederholten Ätherextraktionen zwar recht kleine Mengen, aber doch so viel herausbekommen, daß man nicht von ihnen absehen konnte. Er fand bei der ersten Extraktion 10,4 mg Cholesterin, bei der zweiten 3,0 mg, bei der vierten 1,0 mg, bei der sechsten 0,4 mg und bei der siebenten 0,5 mg. Eine andere Ausstellung, die Thaysen macht, ist die, daß das als Ester vorhandene Cholesterin bei dieser Behandlung nicht vollständig freigemacht wird, so daß in der Fraktion „nicht verseifbare Substanz" nicht nur Cholesterin, sondern auch unveränderte Cholesterinester enthalten sind. Daß diese Ausstellung völlig befugt ist, dafür sprechen die oben (S. 106) erwähnten Versuche, Cholesterinölsäureester zu verseifen, sowohl der von mir als der von Thaysen ausgeführte, sowie die in Thaysens Tabelle befindlichen Werte, die erhalten wurden, als Pulver von Serum mit 20 proz. Natronlauge 3—4 Stunden lang gekocht wurde. Kumagawa und Sutos eigene Angaben deuten übrigens auf etwas Ähnliches; sie sprechen nämlich von einer „nicht näher bestimmten, nicht verseifbaren Substanz, die sich nicht quantitativ von dem Cholesterin" nach ihrer Methode trennen läßt, und die sie als einen Fettalkohol auffassen wollen. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß diese unbekannte Substanz eben unveränderte Cholesterinester sind.

Ferner haftet dieser Methode noch ein Fehler an: sie gibt nämlich bei direkter Verseifung von Blut und Blutbestandteilen viel zu niedrige Werte, was Shimidzu[1]) in einer Untersuchung nachgewiesen hat. Die Erklärung dafür, daß man hierbei schlechtere Resultate erhielt, ist nach Shimidzu die, daß, wenn Blut oder Serum nach der Kumagawa-Sutoschen Methode behandelt worden, beim Schütteln mit Äther eine Emulsion entstand, so daß der Äther, auch wenn er sehr lange stehengelassen wurde, sich nicht von der darunterliegenden Flüssigkeitsschicht trennte. Dagegen erhielt Shimidzu gute Werte, wenn er zuerst das Blut mit absolutem Alkohol fällte, dann die Fällung mit kochendem Alkohol extrahierte und erst danach die Verseifung an dem hierbei erhaltenen Extrakt nach dem Kumagawa-Sutoschen Verfahren ausführte.

In seiner Beschreibung von Fettbestimmungsmethoden in Abderhaldens Biochem. Arbeitsmethoden führt Kumagawa dies an und betont, daß die direkte Verseifungsmethode sich nicht für Blut und Blutbestandteile sowie für Gehirnsubstanz u. a. eignet, er empfiehlt statt dessen eine vorhergehende Alkoholextraktion nach folgendem Verfahren. Blut wird mit dem 3—5fachen Volumen abs. Alkohols übergossen und 24 Stunden lang stehengelassen. Die entstandene Fällung wird quantitativ

[1]) Diese Zeitschr. 28, 237. 1910.

Digitized by Google

in eine Patrone von Filtrierpapier übergeführt und mit abs. Alkohol gewaschen. Danach wird die Fällung mit kochendem abs. Alkohol unter Rücklaufkühler 3—5 Stunden lang extrahiert. Der von den verschiedenen Behandlungen des Blutes her gesammelte Alkohol wird nun in einen Kolben gebracht und 7—8 ccm gesättigte NaOH-Lösung hinzugesetzt, wonach die Lösung $^1/_2$—1 Stunde unter einem Kühler kochen gelassen wird. Der Alkohol wird abgedampft, der Rückstand in einer geringen Menge Wasser gelöst und in einen Scheidetrichter übergeführt, worauf die weitere Behandlung nach Kumagawa-Sutos oben angegebener Methode vor sich geht.

Daß man auf diese Weise eine quantitative Extraktion erhält, kann im Hinblick auf Shimidzus Arbeit als sicher angesehen werden. Doch bleibt der Einwand bezüglich der sicherlich unvollständigen Verseifung der Cholesterinester bestehen, denn trotzdem die Verseifung in kochendem Alkohol geschieht, ist die Kochzeit allzu kurz, als daß die Cholesterinester vollständig verseift werden könnten.

Grigaut[1]) hat bei seiner Methode, das Gesamtcholesterin in größeren Mengen Blut oder Geweben zu bestimmen, ein Verfahren benutzt, das dem Kumagawa-Sutoschen ähnelt. Er betont, und sicherlich mit Recht, daß das Cholesterin und die Cholesterinester irgendwie u. a. an die Eiweißstoffe gebunden sind, und daß das Cholesterin zuerst aus diesen Verbindungen freigemacht werden muß, bevor sie extrahiert werden können. Er zeigt durch Beispiele, daß man bei direkter Ätherextraktion aus Serum nur eine minimale Menge des Cholesterins in den Äther hinüberbringt, und auch bei Extraktion von getrocknetem Serum mit Äther in einem Soxhlet-Apparat während 8 Tagen gelang es ihm nicht, ein volles Drittel des Cholesterins herausgelöst zu erhalten.

Seine Technik ist folgende. In einem Kolben werden zu etwa 20 ccm Serum 20 ccm 10-normalige Natronlauge oder zu 5—10 g frischem Gewebe 40 ccm 5-normalige Natronlauge hinzugesetzt. Der Kolben mit Inhalt wird in einen Autoklav gestellt und auf 110° eine Stunde lang erhitzt. Die alkalische Lösung wird in einen Scheidetrichter übergeführt und mit 60 ccm Äther geschüttelt. Der Äther trennt sich von der darunterliegenden Flüssigkeitsschicht, worauf diese abgelassen wird, um dann einer neuen Ätherextraktion mit dem gleichen Volumen Äther wie vorher unterzogen zu werden. Der Äther von den beiden Extraktionen her wird abgedampft; der Rückstand, der eine bräunliche Farbe hat, wird in 50 ccm Alkohol gelöst, dem 1 ccm 1 proz. Natriumalkoholat hinzugesetzt worden ist. Die Lösung wird auf Wasserbad eingedampft und der Rückstand eine halbe Stunde lang bei 100° getrocknet, worauf Petroleumäther hinzugesetzt wird, welcher das Cholesterin, nicht aber die Verunreinigungen löst. Das

[1]) Le Cycle de la Cholestérinémie. Paris 1913.

Digitized by Google

erhaltene Cholesterin ist vollkommen rein, und seine Menge wird dann durch Wägung bestimmt.

Grigauts Verfahren ist von Pouchet, Labbé, Legendre, Grimbert und Meillière[1]) nachgeprüft worden, welche feststellen konnten, daß man nach demselben ein vollkommen reines Produkt mit einem Schmelzpunkt zwischen 145° und 148° erhielt.

Bei diesem Verfahren wird sicherlich eine kräftigere Verseifung als nach der Methode Kumagawa-Sutos erhalten, und es ist anzunehmen, daß die Cholesterinester eine vollständige Verseifung erfahren, weshalb dieses Verfahren zu empfehlen ist, wenn man den gesamten Cholesteringehalt zu bestimmen wünscht.

Bei seiner colorimetrischen Methode setzt Grigaut zu 2 ccm Serum in einem Scheidetrichter 15 ccm alkalischen 60 proz. Alkohol mit einem Gehalt von $^1/_2$% NaOH hinzu. Das Serum und der Alkohol werden gut miteinander gemischt, worauf die Mischung mit 30 ccm Äther geschüttelt wird. Drei solche Ätherbehandlungen werden vorgenommen. Der Äther wird abgedampft und der Cholesteringehalt colorimetrisch auf die oben (S. 110) erwähnte Weise bestimmt.

Grigaut zeigt, daß Alkohol allein hinreichend ist, um das Serum so zu beeinflussen, daß das Cholesterin und seine Ester sich durch den Äther herauslösen lassen: er setzt aber Alkali hinzu, um die Ausfällung der Eiweißstoffe durch den Alkohol zu verhindern.

Autenrieth und Funk bedienen sich gleichfalls einer Vorbehandlung mit Alkali. 2 ccm Serum oder die entsprechende Menge Gewebe werden mit 20 ccm 25 proz. Kalilauge 2 Stunden lang gekocht. Das Cholesterin wird aus der alkalischen Lösung mittels Äther oder Chloroform extrahiert, um dann colorimetrisch bestimmt zu werden. Es ist wohl kaum wahrscheinlich, daß hierbei eine vollständige Verseifung eintritt, doch ist dies wohl von keiner weiteren Bedeutung, da das als Ester gebundene Cholesterin nach Autenrieth-Funks Angaben denselben Wert bei der colorimetrischen Bestimmung gibt wie das freie.

Sowohl Grigaut als Autenrieth-Funk betonen mit großer Bestimmtheit, daß sie mittels ihrer Verfahren eine quantitative Extraktion erhalten.

Windaus bediente sich bei seinen Untersuchungen eines anderen, für die Lipoide sicherlich weniger eingreifenden Verfahrens. Feinverteilte Organmasse wurde mit der 3fachen Gewichtsmenge wasserfreiem Gips verrührt. Nachdem die Masse erstarrt war, wurde sie zu einem feinen Pulver zerstoßen, das in einem Soxhlet-Apparat mit Äther 3—5 Tage lang extrahiert wurde. Das Ätherextrakt wurde in Alkohol gelöst, und das freie und das gebundene Cholesterin wurden je für sich nach der Windausschen Digitoninmethode bestimmt.

Von anderen bei Cholesterinbestimmungen benutzten Methoden will ich ferner die Bloor's erwähnen. Bei ihr läßt man Blut oder Serum langsam in eine Mischung von 3 Teilen Alkohol und 1 Teil Äther hinabfließen.

---

[1]) Semaine méd. **18**, 215. 1912.

Digitized by Google

Das Ganze wird zum Kochen erhitzt, worauf der Alkohol filtriert wird. Von dem Alkohol wird eine bestimmte Menge genommen, zu der Natriumalkoholat hinzugesetzt wird, worauf der Alkohol eingedampft, der Rückstand getrocknet, in Chloroform gelöst und das Cholesterin nach Autenrieth-Funk bestimmt wird.

Wie oben erwähnt, gibt die Autenrieth-Funksche colorimetrische Methode nicht so zuverlässige Werte wie die Digitoninmethode, wenn die Bestimmungen an reinen Cholesterinlösungen vorgenommen werden. Autenrieth und Funk geben selbst an, daß ihre Methode höhere Werte als die Grigautsche gibt, und vermuten, daß die Ursache hiervon die ist, daß Grigaut mittels seines Verfahrens keine quantitative Extraktion erhält. Grigaut betont indessen, wie oben erwähnt, daß seine Methode eine quantitative Extraktion gibt, und er zeigt des weiteren, daß er übereinstimmende Werte für das Gesamtcholesterin bei Paralleluntersuchungen erhält, ausgeführt teils an kleinen Mengen Serum mittelst seiner colorimetrischen Methode, teils an größeren Mengen Serum durch Alkalibehandlung in Autoklav bei 110°, Ätherextraktion der alkalischen Lösung und danach Wägung des gereinigten Cholesterins. Autenrieth und Funk geben ferner an, daß sie mit ihrer colorimetrischen Methode Werte erhalten, die mit den durch Windaus' sowie Kumagawa-Sutos Methoden erhaltenen übereinstimmen. Sie führen weiterhin eine Untersuchung an einer Blutprobe an, bei der sie Bestimmungen teils mit ihrer und teils mit der Windausschen Methode machten. Bei letzterer wurden 50 ccm Blut mit 200 g wasserfreiem Gips verrührt, die Masse pulverisiert und bei 100° 2—3 Stunden lang getrocknet. Danach wurde das Pulver in einem Soxhlet-Apparat 10—12 Stunden lang täglich während 6 Tagen extrahiert. Das Ätherextrakt wurde in 20 ccm absolutem Alkohol gelöst und der Lösung 1 g metallisches Natrium hinzugesetzt, worauf diese auf einem kochenden Wasserbad $^1/_4$ Stunde lang stehen gelassen wurde. Danach wurde Wasser hinzugesetzt und das Cholesterin in einem Scheidetrichter mit Äther extrahiert, um sodann nach Windaus' Digitoninmethode bestimmt zu werden. Autenrieth und Funk erhielten hierbei einen Wert für das Gesamtcholesterin entsprechend 0,193% des Blutes, während sie, wenn die Untersuchung nach ihrer gewöhnlichen Methode ausgeführt wurde, Werte entsprechend einem Gehalt von 0,190% und 0,194% Cholesterin im Blute erhielten. Diese Untersuchung soll nach Autenrieth und Funk eine Stütze für die Zuverlässigkeit ihrer colorimetrischen Methode liefern; indessen ist diese Ansicht, wie ich sogleich zeigen werde, durchaus nicht richtig.

Es ist nämlich von mehreren Forschern nachgewiesen worden, daß eine Ätherextraktion von eingetrocknetem Serum oder Blut ein sehr schlechtes Resultat gibt. So z. B. extrahierte Grigaut, wie oben erwähnt, Pulver von eingetrocknetem Serum 8 Tage lang mit Äther in einem Soxhlet-Apparat und erhielt kaum ein Drittel des Gesamtcholesterins extrahiert. Thaysen trocknete Serum mit wasserfreiem Na_2SO_4 und extrahierte das Pulver 7 Tage lang, wobei er 4 mg freies und 13 mg gebundenes Cholesterin erhielt; nach Zerkochen mit 20 proz. Natronlauge erhielt er später weitere 8,1 mg

Digitized by Google

freies und 1,9 mg gebundenes Cholesterin. Thaysen hat ferner gezeigt, daß er bei Ätherextraktion aus getrockneten und pulverisierten Organen bedeutend niedrigere Werte für Cholesterin und Cholesterinester erhielt, wenn das Trocknen des Organpulvers bei 100° geschah, als wenn das Trocknen bei Zimmertemperatur vor sich ging, und dasselbe gilt aller Wahrscheinlichkeit nach auch betreffs Serum oder Blut. Man kann demnach mit ziemlich großer Sicherheit behaupten, daß Autenrieth und Funk bei ihrer oben angeführten Untersuchung keine quantitative Extraktion des freien und des als Ester gebundenen Cholesterins erhielten.

Ferner verseiften sie mit Natriumalkoholat nur $^1/_4$ Stunde lang, und Thaysen hat gezeigt, daß er bei Verseifung von Cholesterinölsäureester mit Natriumalkoholat nach 1 Stunde auf Wasserbad 71,20% des Esters verseift erhielt. Man kann somit als ziemlich sicher annehmen, daß Autenrieth und Funk keine vollständige Zersetzung des als Ester gebundenen Cholesterins erhielt, weshalb der durch Digitoninbestimmung erhaltene Wert für das Gesamtcholesterin niedriger sein muß als der wirkliche. Es sind also zwei Fehlerquellen in Autenrieth und Funks Untersuchung, die beide dazu beitragen, den erhaltenen Wert für das Cholesterin herabzusetzen, und doch stimmt dieser Wert sehr gut mit denen überein, die mittelst Autenrieth und Funks gewöhnlicher Methode erhalten wurden. Sofern die Angaben über diese Untersuchung richtig sind, und das kann man kaum bezweifeln, so ergibt sich mithin aus unseren Darlegungen, daß die Zuverlässigkeit der Autenrieth-Funkschen Methode und der mittels derselben erhaltenen Werte stark zu bezweifeln ist.

Bei meinen chemischen Untersuchungen über den Cholesteringehalt von Organen bediente ich mich zunächst desselben Verfahrens betreffs der Vorbehandlung und Extraktion der Organe, wie Thaysen es bei seinen Untersuchungen angewandt hatte. Zum Trocknen von Organen empfiehlt er die von Rubow[1]) und Erlandsen[2]) angewandte Technik. Die Organe wurden zermahlen und die zermahlene Masse in dünner Schicht ausgebreitet und in einem warmen Luftstrom getrocknet, dessen Temperatur um 30° herum gehalten wurde und nie 35° überstieg. Die getrocknete Masse wurde zu einem feinen Pulver zerstoßen und einem Nachtrocknen in Vakuum über konz. Schwefelsäure mindestens 48 Stunden lang unterzogen.

Thaysen hat das Extraktionsvermögen des Äthers betreffs eines auf die soeben angegebene Weise erhaltenen Organpulvers untersucht und gefunden, daß der Äther in einem Soxhlet-Apparat binnen 48 Stunden die Menge Cholesterin und Cholesterinester extrahierte, die man überhaupt mittels dieses Extraktionsmittels herausbekommen konnte. Ferner konnte Thaysen zeigen, daß der Äther, praktisch genommen, eine quantitative Extraktion sowohl des Cholesterins als der Cholesterinester ergab, wenn die Organe auf die angegebene Weise getrocknet worden waren. Er extrahierte so das Organpulver mit Äther 48 Stunden lang, kochte es danach mit Alkohol 5—6 Stunden lang und unterzog es einer neuen Ätherextraktion

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **52**, 173. 1904.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **51**, 71. 1907.

Digitized by Google

48 Stunden lang. Schließlich wurde das Organpulver in ein Becherglas übergeführt und mit 20 proz. Natronlauge 3—4 Stunden lang auf Wasserbad gekocht, worauf die Flüssigkeit mit HCl neutralisiert und zur Trockne eingedampft wurde. Die getrocknete Masse wurde pulverisiert und mit Äther im Soxhletapparat 24 Stunden extrahiert. Die Ausbeute bei den verschiedenen Extraktionen wurde je für sich untersucht.

Dagegen gelang es Thaysen nicht, eine quantitative Extraktion allein mit Äther zu erhalten, wenn er auf dieselbe Weise Blutkörperchen und Serum behandelte. Besonders betreffs des letzteren ergab die direkte Ätherextraktion ein sehr schlechtes Resultat, und auch die nachfolgende Alkohol-Ätherextraktion, die doch die größte Ausbeute gab, vermochte nicht alles Cholesterin zu entfernen, sondern ziemlich beträchtliche Quantitäten blieben übrig, die erst nach einem Zerkochen des Serumpulvers mit Alkali erhalten wurden.

Ich führe hier Thaysens Tabelle über diese seine Untersuchungen an.

Tabelle VI. (Nach Thaysen.)

	Trockensubstanz	Ätherextraktion		Alkohol-Ätherextraktion		NaOH-Behandlung, Ätherextraktion	
		Freies Cholesterin	Gebund. Cholesterin	Freies Cholesterin	Gebund. Cholesterin	Freies Cholesterin	Gebund. Cholesterin
	g	mg	mg	mg	mg	mg	mg
Leber Nr. 5	7,162	50,8	2,5	—	0,5	—	Spur
„ „ 1	5,089	19,3	27,6	—	0,6	0,5	0,2
Ochsenniere	3,323	37,9	12,4	—	0,2	Spur	Spur
Hundeniere	6,169	116,3	13,2	1,2	1,2	—	Spur
Nebenniere	2,206	49,8	257,3	—	1,8	—	0,8
Ochsenblutkörperchen	8,675	32,2	1,5	—	0,5	—	1,2
„	12,777	50,4	0,3	—	0,7	—	2,9
Ochsenserum I . . .	7,171	1,4	11,5	21,1	56,4	16,8	8,7
„ II . . .	7,230	1,3	3,9	20,1	51,2	7,3	5,5
„ III . . .	8,770	0,5	2,5	7,5	46,7	4,1	3,2
„ IV . . .	10,606	0,5	0,6	12,5	50,3	2,3	2,6
„ V . . .	9,487	—	—	13,8	30,5	5,4	2,1
„ VI . . .	6,910	1,3	1,6	—	—	21,6	21,6

Thaysen ist auf Grund seiner Untersuchungen der Ansicht, daß das geeignetste Extraktionsverfahren eine Alkohol-Ätherbehandlung des Organpulvers ist, so daß dieses zuerst mit 96 proz. Alkohol 4—5 Stunden lang gekocht, danach das Pulver in einen Soxhlet-Apparat übergeführt und mit Äther 48 Stunden lang extrahiert wird. Das gesammelte Extrakt wird dadurch gereinigt, daß es in absolutem Äther gelöst und dieser filtriert wird. Der Äther wird eingedampft und der Rückstand getrocknet. Thaysen warnt indessen davor, das Extrakt bei 100° zu trocknen, sondern am besten geschieht das Trocknen im Vakuum; er fand nämlich, daß das Extrakt durch eine starke Erwärmung in der Weise beeinflußt wurde, daß das freie Cholesterin danach nur unvollständig von dem Digitonin gefällt wurde. Nach dem Trocknen wird das Extrakt in Alkohol gelöst, und das freie und das

Digitized by Google

als Ester gebundene Cholesterin werden auf zuvor geschilderte Weise bestimmt.

Betreffs Blut und Serum betont Thaysen, daß die einzige Möglichkeit, bei ihnen eine quantitative Extraktion zu erhalten, darin besteht, daß man das Pulver mit 20 proz. Natronlauge zerkocht. Indessen zieht er hierbei nicht die Möglichkeit in Betracht, daß die Cholesterinester dabei wenigstens zu einem Teil verseift werden können, so daß die Werte, die er sowohl für das freie wie für das gebundene Cholesterin erhält, möglicherweise unrichtig werden, auch wenn der Wert für die Summe von freiem und gebundenem Cholesterin richtig ist.

Als ich meine quantitativen chemischen Untersuchungen betreffs des Gehalts gewisser Organe an freiem und als Ester gebundenem Cholesterin begann, folgte ich genau Thaysens Vorschriften. Organmasse wurde in Luftstrom bei etwa 30° getrocknet und nach Pulverisierung dadurch extrahiert, daß sie zuerst mit Alkohol gekocht und danach mit Äther im Soxhlet-Apparat extrahiert wurde. Um zu prüfen, ob die Extraktion vollständig war, führte ich außerdem einige Paralleluntersuchungen in der Weise aus, daß das Organpulver direkt mit Alkali ohne vorhergehende Alkohol-Ätherextraktion behandelt und danach mit Äther extrahiert wurde. Ich kochte also Organpulver mit 10 proz. Natronlauge auf Wasserbad ungefähr $^3/_4$ Stunde, d. h. bis das Pulver von der Lauge gelöst worden war. Ich verwendete 10 proz. statt 20 proz. Natronlauge, um sicher zu sein, daß die Cholesterinester nur in geringem Maße verseift würden. Nachdem das Pulver in der Lauge gelöst worden, wurde die Lösung mit HCl neutralisiert, das Wasser eingedampft und der getrocknete und pulverisierte Rückstand mit Äther im Soxhlet-Apparat etwa 72 Stunden lang extrahiert. Die in Tabelle VII angeführten Werte beziehen sich auf diese Bestimmungen. Die Trockensubstanz wurde teils in dem frischen Organ, teils in dem Organpulver durch Trocknen im Trockenofen bei 100° C zu Gewichtskonstanz bestimmt.

Wie aus den Zahlen in Tabelle VII hervorgeht, erhielt ich nicht übereinstimmende Werte für freies und gebundenes Cholesterin in den Bestimmungen an demselben Organpulver. Die Werte für das freie Cholesterin sind niedriger in den Fällen, wo das Organpulver mit Alkohol-Äther extrahiert worden ist, Versuche 1, 3 und 5, und die Werte für das gebundene Cholesterin zeigen eine entsprechende Erhöhung bei Vergleich mit den Werten

Digitized by Google

Tabelle VII.

Versuch Nr.	Behandlung des Pulvers	Organ	Art des Falles	Abgewogenes getrocknetes Organpulver in g	Entspricht in Trockensubstanz in g	Freies Cholesterin			Gebundenes Cholesterin			Gesamter Cholesteringehalt der Trockensubstanz in %
						Digitonincholesterid in mg	Cholesterin in mg	Cholesterin der Trockensubstanz in %	Digitonincholesterid in mg	Cholesterin in mg	Cholesterin der Trockensubstanz in %	
1	Alkohol-Ätherextraktion.	Leber.	Diabetes.	0,8599	0,7946	2,4	0,6	0,075	32,5	7,9	1,0	1,075
2	Kochen mit 10% NaOH, Ätherextraktion.	dgl.	dgl.	1,3831	1,2665	49	11,9	0,94	12,2	2,9	0,23	1,17
3	Alkokol-Ätherextraktion.	Rechte Niere	dgl.	1,1311	1,0437	49,9	12,10	1,16	40,6	9,8	0,94	2,10
4	Kochen mit 10% NaOH, Ätherextraktion.	dgl.	dgl.	1,2478	1,1514	69,3	16,8	1,463	6,1	1,5	0,128	1,59
5	Alkohol-Ätherextraktion.	Linke Niere	dgl.	1,0782	1,0063	41,1	9,99	0,99	46,8	11,4	1,13	2,12
6	Kochen mit 10% NaOH, Ätherextraktion.	dgl.		1,3631	1,2722	79,5	19,3	1,519	6,5	1,6	0,124	1,643

Digitized by Google

die durch eine Behandlung mit 10proz. Natronlauge und eine nachfolgende Ätherextraktion des mit HCl neutralisierten und dann eingetrockneten Substrats erhalten worden sind. Am größten ist der Unterschied zwischen den Werten in den Doppelbestimmungen für die Leber, geringer, aber völlig deutlich, für die Nieren. Der Gesamtcholesteringehalt ist für die Leber am höchsten in dem Versuch mit Alkalibehandlung: betreffs der Nieren ist das Umgekehrte der Fall, indem hier Alkohol-Ätherbehandlung des Organpulvers die größte Ausbeute ergibt.

Es ist klar, daß so variierende Werte für freies und gebundenes Cholesterin, wie sie bei diesen Untersuchungen, deren je zwei an demselben Organpulver, aber mit verschiedener Extraktionstechnik ausgeführt worden, erhalten wurden sind, nicht zuverlässig sein können. Es erhebt sich sofort die Frage, ob die eine oder ob beide Doppelbestimmungen fehlerhaft sind, und wo der Fehler möglicherweise liegen kann. Der nächstliegende Gedanke ist der, daß die Alkalibehandlung vielleicht die Cholesterinester zersetzt haben kann, so daß hierdurch die Werte für das freie Cholesterin niedriger geworden wäre.

Um dies klarzustellen, führte ich einige Untersuchungen an Leber und der einen Niere in einem Falle von perniziöser Anämie aus. Als Ausgangsmaterial benutzte ich teils frische, teils nach Thaysens Vorschriften eingetrocknete und pulverisierte Organmasse. Ein Teil des feuchten Organs wurde mit 2proz. Natronlauge behandelt und auf Wasserbad gekocht, bis die Masse gelöst war, worauf das Cholesterin und die Cholesterinester aus der alkalischen Lösung in Scheidetrichter mit Äther extrahiert wurden. Des näheren wird das Verfahren später auf S. 129 beschrieben werden. Zu einem anderen Teil der frischen, feuchten Organmasse wurde die doppelte Gewichtsmenge wasserfreies Na_2SO_4 hinzugesetzt, die erstarrte Masse wurde fein pulverisiert und zuerst mit Äther im Soxhlet-Apparat 48 Stunden lang extrahiert, danach das Pulver mit Alkohol gekocht, worauf aufs neue mit Äther 12 Stunden lang extrahiert wurde. Die Organpulver wurden mit Alkohol-Äther nach Thaysen extrahiert. Außerdem wurde ein Nierenpulver mit 2proz. Natronlauge zerkocht und die alkalische Flüssigkeit mit Äther in Scheidetrichter extrahiert.

Die bei diesen Bestimmungen erhaltenen Werte sind in Tabelle VIII wiedergegeben.

Digitized by Google

Tabelle VIII.

Versuch Nr.	Behandlungsweise und Extraktion	Organ	Menge feuchtes Organ in g	Menge Trockensubstanz in g	Pulvermenge in g	Trockensubstanz im Organ in %	Freies Cholesterin: Digitonincholesterid in mg	Freies Cholesterin: Cholesterin in mg	Freies Cholesterin: Cholesterin d. feuchten Organs in %	Freies Cholesterin: Cholesterin d. Trockensubstanz in %	Gebundenes Cholesterin: Digitonincholesterid in mg	Gebundenes Cholesterin: Cholesterin in mg	Gebundenes Cholesterin: Cholesterin d. feuchten Organs in %	Gebundenes Cholesterin: Cholesterin d. Trockensubstanz in %	Gesamtcholesteringehalt: des feuchten Organs in %	Gesamtcholesteringehalt: d. Trockensubstanz in %
1	Behandlung mit 2% NaOH; Ätherextraktion der alkalischen Lösung	Feuchte Leber	24,21	5,09		21,04	236,2	57,42	0,237	1,13	93,8	22,8	0,094	0,45	0,331	1,58
2	Trocknen mit Na_2SO_4; Äther-Alkohol-Ätherextraktion	dgl.	16,1	3,38		21,04	165,7	40,3	0,250	1,16	68,3	16,6	0,1	0,45	0,35	1,61
3	Trocknen nach Thaysen; Alkohol-Ätherextraktion	Leberpulver		3,57	3,885	21,04	125,6	30,5		0,85	116,9	28,4		0,79		1,64
4	dgl.	dgl.		1,916	2,0852	21,04	55,0	11,4		0,70	75,1	18,25		0,95		1,65
5	dgl.	dgl.		4,47	4,8652	21,04	136,9	33,3		0,74	163,6	39,78		0,89		1,63
6	Behandlung mit 2% NaOH; Ätherextraktion der alkalischen Lösung	Feuchte Niere	9,2	1,52		16,59	95,4	23,19	0,252	1,52	4,9	1,2	0,013	0,08	0,265	1,60
7	Trocknen mit Na_2SO_4; Äther-Alkohol-Ätherextraktion	dgl.	6,7	1,11		16,59	70,9	17,23	0,257	1,55	3,9	0,9	0,013	0,08	0,270	1,63
8	Trocknen nach Thaysen; Alkohol-Ätherextraktion	Nierenpulver		2,65	3,026	16,59	125,5	30,0		1,14	73,2	17,8		0,67		1,81
9	dgl.	dgl.		1,108	1,265	16,59	49,2	12,0		1,08	34,7	8,43		0,75		1,84
10	Behandlung des Organpulvers mit 2% NaOH; Ätherextraktion d. alkalisch. Lösung	dgl.		1,641	1,877	16,59	73,1	17,8		1,08	34,0	7,7		0,47		1,55

Digitized by Google

Aus den Werten in Tabelle VIII ist ersichtlich, daß direkte Alkalibehandlung mit Ätherextraktion der alkalischen Lösung Werte ergibt, die gut mit denen übereinstimmen, welche erhalten werden, wenn dasselbe Organ mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und dann mit Äther und Alkohol-Äther extrahiert werden. Dies gilt sowohl für Leber als für Niere. Ferner sieht man in den Fällen, wo Alkohol-Ätherextraktion an Organpulver ausgeführt worden, Versuche 3, 4, 5, 8, 9 und 10, dieselbe Verschiebung betreffs der Werte für freies und gebundenes Cholesterin zugunsten des letzteren, wie sie Tabelle VII zeigte. Bemerkenswert ist, daß in Versuch 10, wo das Organpulver mit 2 proz. Natronlauge behandelt worden war, dieselbe Verschiebung zugunsten des gebundenen Cholesterins eingetreten ist. Der Gesamtcholesteringehalt hält sich in allen Versuchen an Leber auf ungefähr derselben Höhe mit nur geringen Variationen zwischen den einzelnen Versuchen. Betreffs der Niere ist der Gesamtcholesteringehalt am größten in den Versuchen 8 und 9, wo Nierenpulver mit Alkohol-Äther extrahiert worden ist.

Wie oben betreffs der Werte in Tabelle VII erwähnt, glaubte ich zunächst, daß die höheren Werte für freies Cholesterin in den Versuchen 2, 4 und 6 auf einer Zersetzung der Cholesterinester durch die Alkalieinwirkung beruhen könnte. Indessen zeigen die Resultate der Versuche in Tabelle VIII, daß dies wenig wahrscheinlich ist; zwar sind die Werte für das freie Cholesterin hoch in den Versuchen, wo Organmasse mit Natronlauge behandelt worden, aber nicht höher als in den Versuchen, wo diese Organmasse mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet worden ist. Doch ist zu beachten, daß ich bei den Versuchen in Tabelle VII 10 proz. Natronlauge, in den in Tabelle VIII wiedergegebenen Versuchen nur 2 proz. verwendete, und daß ich bei Behandlung von Nierenpulver mit 2 proz. Natronlauge denselben Wert für das freie Cholesterin erhielt wie bei direkter Extraktion desselben Nierenpulvers mit Alkohol-Äther.

Die Werte in Tabelle VIII deuten darauf hin, daß das Trocknen einen deutlichen Einfluß auf die Werte für gebundenes und freies Cholesterin hat, und daß das freie Cholesterin beim Trocknen auf irgendeine Weise, wahrscheinlich an andere Lipoide, gebunden wird, so daß es nach Extraktion sich nicht quantitativ mit Digitonin ausfällen läßt.

Digitized by Google

In Tabelle IX werden einige Versuche an der Leber eines Falles von Nephritis sowie zwei Bestimmungen an der Leber eines Falles von perniziöser Anämie wiedergegeben. Die Versuche sind ausgeführt worden, um das Resultat der Zahlen in Tabelle VIII zu verifizieren. Feuchte Organmasse von Leber wurde teils durch Kochen mit 2 proz. Natronlauge eine halbe Stunde lang behandelt, worauf Ätherextraktion an der alkalischen Lösung ausgeführt wurde, teils wurde zu der feuchten Organmasse die doppelte Gewichtsmenge wasserfreies Na_2SO_4 hinzugesetzt, die erstarrte Masse fein pulverisiert und sofortiger Ätherextraktion im Soxhlet-Apparat mindestens 100 Stunden lang unterzogen; eine Alkoholbehandlung wurde nicht vorgenommen. Ein Teil der feuchten Organmasse wurde an der Luft getrocknet und fein pulverisiert. Das Pulver wurde in einer überdeckten Porzellanschale etwa einen Monat lang liegen gelassen und dann in Arbeit genommen, wobei teils Alkohol-Ätherextraktion direkt aus dem Pulver, teils Ätherextraktion aus der alkalischen Lösung nach Zerkochen des Pulvers mit 2 proz. Natronlauge ausgeführt wurde. Außerdem wurde ein Versuch angestellt, wobei dasselbe Organpulver 2 Monate lang gelegen hatte und dann mit 2 proz. Natronlauge behandelt wurde.

In Tabelle IX findet man eine gute Übereinstimmung zwischen den Werten in den Versuchen 1, 2, 3 und 4, sowohl für freies wie für gebundenes Cholesterin, also wo die frische, feuchte Organmasse mit Alkali behandelt oder mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet worden war. Dasselbe gilt für die Versuche 10 und 11. Was die Versuche an luftgetrocknetem Organ betrifft, so findet man in diesen, auch wenn das Organpulver mit Alkali behandelt worden, einen niedrigeren Wert für das freie Cholesterin als in den Versuchen 1—4 mit einem entsprechend höheren Wert für das gebundene. Am niedrigsten ist der Wert für das freie Cholesterin in Versuch 9, wo das Organpulver 2 Monate lang gelegen hat, ehe es untersucht wurde.

Wenn feuchte Organmasse oder Organpulver mit Alkali behandelt werden, erhält man stets ein farbloses, weißes oder schwach weißgelbes Extrakt, dagegen ist das Extrakt nach Alkohol-Ätherbehandlung von Organpulver so gut wie stets braun oder braungelb, und die braune Färbung verschwindet nur unbedeutend, wenn das Extrakt in absolutem Äther gelöst wird. Wenn

Digitized by Google

Tabelle IX.

Versuch Nr.	Behandlungsweise und Extraktion	Organ	Menge feuchtes Organ in g	Menge Trockensubstanz in g	Pulvermenge in g	Trockensubstanz im Organ in %	Freies Cholesterin: Digitonincholesterid in mg	Freies Cholesterin: Cholesterin in mg	Freies Cholesterin: Cholesterin d. feuchten Organs in %	Freies Cholesterin: Cholesterin d. Trockensubstanz in %	Gebundenes Cholesterin: Digitonincholesterid in mg	Gebundenes Cholesterin: Cholesterin in mg	Gebundenes Cholesterin: Cholesterin d. feuchten Organs in %	Gebundenes Cholesterin: Cholesterin d. Trockensubstanz in %	Gesamtcholesteringehalt: d. feuchten Organs in %	Gesamtcholesteringehalt: d. Trockensubstanz in %
1	Behandlung mit 2% NaOH; Ätherextraktion der alkalischen Lösung.	Leber. Nephritis.	19,0	4,3253		22,765	217,6	52,89	0,278	1,223	44,8	10,89	0,057	0,251	0,335	1,474
2	dgl.; Trocknen des Extrakts bei 100°.	dgl. dgl.	18,4	4,1887		22,765	209,4	50,90	0,276	1,215	40,7	9,894	0,055	0,236	0,331	1,451
3	Trocknen mit Na_2SO_4; Ätherextraktion.	dgl. dgl.	13,5	3,0732		22,765	151,0	36,7	0,271	1,194	34,0	8,265	0,061	0,269	0,332	1,463
4	dgl.	dgl. dgl.	16,5	3,7562		22,765	185,0	45,04	0,273	1,199	39,4	9,54	0,058	0,254	0,331	1,453
5	Trocknen nach Thaysen; Alkohol-Ätherextraktion.	Leberpulver, dgl. 1 Monat alt.		2,811	3,1		78,9	19,18		0,682	85,2	20,71		0,736		1,418
6	dgl.; Reinigung des Extrakts vor der Fällung mit Digitonin.	dgl. dgl.		2,72	3,0		76,3	18,54		0,681	76,8	18,6		0,686		1,367
7	Behandlung des Organpulvers mit 2% NaOH; Ätherextraktion der alkalischen Lösung.	dgl. dgl.		3,452	3,807		135,4	32,9		0,953	55,6	13,5		0,392		1,345
8	dgl.; Trocknen des Extrakts bei 100°.	dgl. dgl.		2,5956	2,8628		103,9	25,26		0,973	43,7	10,6		0,409		1,382
9	dgl.	Leberpulver, dgl. 2 Monate alt.		2,631	2,9		65,2	15,8		0,602	81,2	19,74		0,755		1,355
10	Behandlung mit 2% NaOH; Ätherextraktion der alkalischen Lösung.	Leber. Perniziöse Anämie.	15,5	3,8393		21,5442	223,9	54,43	0,351	1,629	29,3	7,12	0,046	0,213	0,397	1,842
11	Trocknen mit Na_2SO_4; Ätherextraktion,	dgl. dgl.	12,5	2,6930		21,5442	180,1	43,78	0,350	1,625	23,6	5,73	0,045	0,213	0,395	1,838

Digitized by Google

nun ein solches braungefärbtes Extrakt im Alkohol gelöst und Digitoninlösung hinzugesezt wird, um das freie Cholesterin zu fällen, so habe ich in mehreren Fällen nur eine sehr unbedeutende Ausfällung von Digitonincholesterid erhalten, durch Zusatz einiger Tropfen Wasser konnte ich aber die erwartete reichliche Fällung hervorrufen. Etwas Ähnliches sah ich nie, wenn die Extrakte ungefärbt und folglich reiner waren. Es läßt sich vermuten, daß die Adhäsion oder Bindung des freien Cholesterins an andere Stoffe durch Zusatz von Wasser gelöst wird, eine weitere Erklärung des fraglichen Phänomens vermag ich jedoch nicht zu geben.

Ferner reißt das ausgefällte Digitonincholesterid die färbenden Stoffe mit sich, so daß es, trotz Waschens mit Äther, wenn es getrocknet worden, eine gelbbraune Farbe anstatt der gewöhnlichen weißen erhält. In Versuch 6, Tabelle IX, löste ich das Extrakt von der Alkohol-Ätherextraktion her in Äther und schüttelte den Äther in einem Scheidetrichter mit 1 proz. Natronlauge, wobei der Äther höchst beträchtlich entfärbt wurde. Bei diesem Versuch erhielt ich einen niedrigeren Wert für das Gesamtcholesterin als in dem Parallelversuch 5. Es ist wohl nicht unwahrscheinlich, daß einige Bestandteile des Extrakts, die nicht Cholesterin sind, in die Fällung mit hineingerissen werden können, und daß man hierdurch unrichtige Werte erhalten kann.

Aus meinen Versuchen in den Tabellen VII, VIII und IX geht mit großer Wahrscheinlichkeit hervor, daß das Cholesterin im Organpulver, wenigstens in Pulver von Leber und Niere, beim Trocknen sich an andere, in Alkohol und Äther lösliche Stoffe bindet, welche auf die quantitative Ausfällung des freien Cholesterins mittels Digitonin einwirken. Diese entstandenen Verbindungen scheinen recht beständig zu sein, denn sie werden nicht durch halbstündiges Kochen auf Wasserbad mit 2 proz. Natronlauge beeinflußt. Möglicherweise kann ein Oxydationsprozeß beim Trocknen, und wenn das Organpulver eine längere Zeit hindurch mit vollem Luftzutritt liegengelassen wird, stattfinden, und es ist nicht ausgeschlossen, daß ein solcher Oxydationsprozeß auf das Cholesterin und sein Verhalten gegen andere Stoffe einwirken kann. Bemerkenswert ist, daß man keine Verschiebung der Werte für das freie und das gebundene Cholesterin wahrnimmt, wenn frische Organmasse mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und sofort einer Extraktion unterzogen wird, wohl

Digitized by Google

aber, wenn das Organpulver mit Alkali behandelt worden ist, und wunderlicherweise am stärksten in demjenigen Versuch, Nr. 9 in Tabelle IX, wo das Organpulver die längste Zeit nach dem Trocknen gelegen hat, bevor es einer weiteren Untersuchung unterzogen wurde.

Über die Art der Stoffe, die in der erwähnten Hinsicht auf die Ausfällung des Cholesterins mit Digitonin einwirken, kann ich mich nicht äußern. Sie werden jedoch von Alkohol und Äther gelöst und sind wahrscheinlich von Lipoidnatur. Thaysen hat bei seiner Prüfung der Digitoninmethode untersucht, ob Neutralfett, freie fette Säuren oder Phosphatide eine Einwirkung auf die quantitative Ausfällung des Cholesterins mit Digitonin in einer Alkohollösung hätten. Er fand, daß die Gegenwart dieser Stoffe in der Alkohollösung, in welcher reines Cholesterin mittels Digitonin ausgefällt wurde, ohne jede Bedeutung war. Doch muß man hierbei berücksichtigen, daß bei Thaysens Untersuchung das Cholesterin und die genannten anderen Lipoide nur in Berührung miteinander in der Alkohollösung kamen, und daß das Verhalten möglicherweise ein anderes sein kann, wenn diese Stoffe und eventuell ihre Oxydationsprodukte in intimeren Kontakt mit dem Cholesterin kommen, wie das sicherlich der Fall ist, wenn die Organe getrocknet werden. Thaysens Beobachtung, daß eine Erhitzung des Ätherextraktes auf 100° eine Senkung des Wertes für das freie Cholesterin mit sich bringt, deutet auch hierauf hin. Ich habe daher bei meinen Untersuchungen stets das Extrakt nach dem Verdunsten des Äthers im Vakuum getrocknet, weshalb diese Möglichkeit als Ursache der Verschiebung der Werte für freies und für gebundenes Cholesterin zugunsten des letzteren ausgeschlossen ist. In zwei Fällen habe ich jedoch das Extrakt bei 100° getrocknet, nämlich in den Versuchen 2 und 8 in Tabelle IX. Ich konnte nicht finden, daß das Trocknen hierbei einen Einfluß hatte, wenigstens erhielt ich Werte für das freie Cholesterin, die mit denen der Paralleluntersuchungen in den Versuchen 1 und 7 gut übereinstimmten. Andere Angaben betreffs der vorliegenden Frage habe ich in der diesbezüglichen Literatur nicht antreffen können. Doch erwähnt Shimidzu[1]), der Fettbestimmungen an Organen nach Kumagawa-Sutos Methode ausgeführt hat, daß er niedrigere Werte

[1]) Diese Zeitschr. **28**, 237. 1910.

Digitized by Google

erhielt, wenn er die Bestimmung an Organpulver ausführte, als wenn er dieselbe Bestimmung an dem frischen Organ vornahm. Und Tamura[1]) hat gezeigt, daß, wenn Fleischpulver einer Erhitzung auf 50 oder 100° während einer Zeit variierend zwischen 10 und 80 Stunden unter freiem Luftzutritt ausgesetzt wurde, er eine Senkung der Werte sowohl für freie fette Säuren als für unverseifbare Substanz, letztere hauptsächlich aus Cholesterin bestehend, erhielt, und daß die Senkung der Werte mit der Dauer der Erhitzungszeit zunahm. Zwar sind diese letzteren Untersuchungen mittels der Kumagawa-Sutoschen Methode ausgeführt, und die Stoffe, die bestimmt worden, sind teilweise andere als Cholesterin, aber sie zeigen doch, daß das Trocknen nicht ohne Bedeutung ist und daß es auf irgendeine Weise auf die Lipoide einwirkt.

Durch meine oben geschilderten Versuche kam ich zu der Auffassung, daß eine Lufttrocknung als Vorbereitung für die Extraktion der Organe mit Äther nicht anwendbar ist, wenn man freies und als Ester gebundenes Cholesterin nach der Digitoninmethode bestimmen soll, denn auch wenn es gelingt, eine quantitative Extraktion von Cholesterin und Cholesterinestern zu erhalten, so erhält man doch nicht zuverlässige Werte für ihre gegenseitige Menge. Dagegen gibt Trocknen von Organmasse mittels wasserfreiem Na_2SO_4 und nachfolgende Ätherextraktion Werte, die sowohl betreffs des freien wie des gebundenen Cholesterins gut mit denen übereinstimmen, welche durch Behandlung derselben Organmasse mit 2 proz. Natronlauge und darauffolgende Ätherextraktion der alkalischen Lösung erhalten werden. Es ist wohl wahrscheinlich, daß beim Trocknen mit wasserfreiem Na_2SO_4 keine größeren Veränderungen betreffs der Lipoide in den Organen geschehen, und da das Trocknen schnell vor sich geht, kann die Ätherextraktion fast sofort vorgenommen werden.

Bei meinen späteren Untersuchungen habe ich mich einer Vorbehandlung des frischen Organs mit Natronlauge bedient, eines Verfahrens, dessen Prinzip, den Arbeiten Liebermann und Szekelys sowie Kumagawa und Sutos entnommen, darauf ausgeht, das zu untersuchende Gewebe in Alkali zu lösen

[1]) Diese Zeitschr. **41**, 78. 1912.

Digitized by Google

und dann die alkalische Lösung mit Äther im Scheidetrichter zu extrahieren. Ich wandte jedoch eine weit niedrigere Konzentration der Natronlauge an, als es in den oben genannten Arbeiten der Fall gewesen ist, da ich eine Verseifung der Cholesterinester zu vermeiden wünschte. Das Verfahren ist folgendes.

In einem Kolben wird die gewünschte Menge zermahlenes oder in Stücke zerschnittenes Organ abgewogen und ungefähr die doppelte Gewichtsmenge 2 proz. Natronlauge hinzugesetzt. Der Kolben mit Inhalt wird darauf in Zimmertemperatur 3—4 Stunden stehengelassen, d. h. bis die Organmasse aufgequollen ist und eine gallertige, durchsichtige Beschaffenheit angenommen hat, und erst danach wird der Kolben auf kochendem Wasserbad erhitzt, bis die Organteile sich in der Lauge gelöst haben, was gewöhnlich binnen einer halben Stunde geschehen ist. Man erhält dann eine braunrote, ziemlich klare Flüssigkeit. Diese wird in einen Scheidetrichter übergeführt und der Kolben mehrmals mit kleinen Mengen dest. Wassers ausgespült, die gleichfalls in den Scheidetrichter gegossen werden. Ungefähr 150 ccm Äther werden nun in der Weise hinzugesetzt, daß der Äther in mehreren Portionen zuerst in den Kolben, dessen Wände mit Äther gespült werden, und dann aus diesem in den Scheidetrichter gegossen wird. Der Scheidetrichter wird mehrmals mit halbstündigen Zwischenräumen kräftig geschüttelt und dann mindestens 12 Stunden lang stehengelassen. Es hat sich dann Äther von einer darunterliegenden alkalischen Flüssigkeit abgeschieden, welch letztere in einen anderen Scheidetrichter abgelassen wird. Der Äther in dem ersten Scheidetrichter wird ein paarmal mit kleinen Mengen dest. Wassers gewaschen, welches Wasser dem zweiten Scheidetrichter zugeführt wird, worauf man in den letzteren ungefähr 150 ccm Äther gießt und eine zweite Ätherextraktion auf dieselbe Weise wie die erste vornimmt. Frühestens nach 12 Stunden wird die alkalische Flüssigkeit abgezapft und der Äther in den ersten Scheidetrichter übergeführt. Der Äther wird hiernach mit durch Zusatz einiger Tropfen Natronlauge alkalisch gemachtem Wasser gewaschen, mit etwa 20 ccm jedesmal, bis das Waschwasser nicht mehr bei Zusatz von HCl opalisierend wird, d. h. nicht mehr Seifen enthält. Danach wird der Äther mit dest. Wasser gewaschen, bis das Waschwasser keine alkalische Reaktion mehr gibt, wenn man Phenolphthalein hinzusetzt.

Digitized by Google

Das Wasser wird abgelassen und der Äther in mehreren Portionen in einen weithalsigen kleineren Kolben gebracht, in welchem der Äther verdunsten gelassen und der Rückstand getrocknet wird. Das Extrakt besteht so gut wie ausschließlich aus Cholesterin und Cholesterinestern und kann nach Trocknen zur Bestimmung des freien und gebundenen Cholesterins auf gewöhnliche Weise nach der Digitoninmethode in Arbeit genommen werden.

Im Hinblick auf die Resultate, die Thaysen bei Versuchen mit der Kumagawa-Sutoschen Methode erhielt, und über die oben berichtet wurde, möchte man es kaum für wahrscheinlich halten, daß man durch zwei Ätherextraktionen auf angegebene Weise eine quantitative Extraktion der alkalischen Flüssigkeit erzielen könnte. Ich habe indessen wiederholt geprüft, ob die Extraktion vollständig gewesen, indem ich eine dritte und vierte Ätherextraktion an der alkalischen Flüssigkeit vorgenommen, und nachdem die gesamte Äthermenge von diesen letzten Extraktionen her auf gewöhnliche Weise gewaschen und der Äther in einem kleineren Kolben zum Verdunsten gebracht worden war, habe ich diesen mit 5 ccm Chloroform gespült, an dem ich dann die Liebermann-Burchardsche Reaktion ausgeführt habe. Diese ist stets negativ ausgefallen.

Dieses Verfahren mit Alkalibehandlung frischer Organmasse ist leichter und bequemer auszuführen als Trocknen mittels Na_2SO_4. Ferner hat es den großen Vorteil, daß man, wenn die Organmasse in der Natronlauge gelöst worden, Äther direkt in dem Kolben zur Lösung hinzusetzen und diesen verschlossen stehenlassen kann, bis man Zeit hat, die Untersuchung fortzusetzen. Es ist nämlich so, daß man nur eine geringere Anzahl Untersuchungen gleichzeitig in Gang haben kann, und es ist daher fast notwendig, auf diese Weise seine Präparate sammeln zu können. Ich habe auch in so gut wie allen meinen Untersuchungen die alkalische Lösung so längere oder kürzere Zeit stehen gehabt.

Daß bei dieser Aufbewahrung der gelösten Organpräparate keine Veränderung des freien und gebundenen Cholesterins stattfindet, war zwar zu erwarten, um aber völlig sicher zu sein, führte ich folgenden Versuch aus.

Ungefähr 60 g feuchte, frische Lebermasse wurde mit etwa 100 ccm Äther in einer Flasche mit gut schließendem Glaspfropfen

Digitized by Google

1/2 Stunde lang geschüttelt, worauf die Flasche bis zum folgenden Tage stehengelassen wurde. Der Äther wurde nun in einen Kolben abgegossen und neuer Äther hinzugesetzt. Vier solche Ätherextraktionen wurden gemacht. Ich extrahierte die Organmasse direkt mit Äther, ohne sie einer anderen Behandlung als mechanischer Zerkleinerung unterzogen zu haben, um zu prüfen, ob freies und gebundenes Cholesterin in einem derart erhaltenen Extrakt eine Veränderung betreffs ihres Verhältnisses zueinander, verglichen mit demselben Extrakt, behandelt mit 2 proz. Natronlauge, erfahren. Das Extrakt von den Ätherbehandlungen her wurde in absolutem Äther gelöst, die Lösung filtriert und der Äther zum Verdunsten gebracht, worauf das Extrakt in 200 ccm 92 proz. Alkohol gelöst wurde. Von dieser Lösung wurden in jedem von vier Kolben 50 ccm abgemessen. In Kolben 1 und 2 wurde direkte Bestimmung auf freies und gebundenes Cholesterin vorgenommen. In Kolben 3 und 4 wurde der Alkohol eingedampft, bis 5 ccm übrig waren, darauf wurden erst 5 ccm Wasser hinzugesetzt, wobei der Inhalt des Kolbens eine milchige Beschaffenheit annahm, und danach 20 ccm 2 proz. Natronlauge. Der Kolben wurde hiernach 3/4 Stunden lang auf kochendem Wasserbad stehengelassen. Der Inhalt des Kolbens 3 wurde sofort mit Äther extrahiert und Bestimmung auf gewöhnliche Weise vorgenommen. Dagegen wurde Kolben 4, nachdem zu der alkalischen Lösung Äther hinzugesetzt worden war, etwa 2 1/2 Monate lang stehengelassen, bevor die Untersuchung auf gewöhnliche Weise zu Ende geführt wurde. Die Resultate dieser vier Versuche sind aus Tabelle X zu ersehen.

Tabelle X.

Behandlung des Extrakts	Kolben Nr.	Freies Cholesterin		Gebund. Cholesterin	
		Digitonin-cholesterid in mg	Cholesterin in mg	Digitonin-cholesterid in mg	Cholesterin in mg
Direkte Bestimmung von Cholesterin am Extrakt	1	166,3	40,42	37,5	9,116
	2	165,5	40,47	38,2	9,286
Behandlung des Extrakts mit 2% NaOH, danach Extraktion und Bestimmung des Cholesterins	3	165,9	40,38	37,7	9,165
	4	166,4	40,45	38,0	9,232

Digitized by Google

Wie aus den Zahlen in Tabelle X hervorgeht, stimmen die Werte für freies und für gebundenes Cholesterin in sämtlichen vier Versuchen so nahe miteinander überein, daß es völlig klar ist, daß ein Kochen mit 2proz. Natronlauge $^3/_4$ Stunden lang nicht merkbar das Verhältnis zwischen freiem und gebundenem Cholesterin im Extrakt beeinflußt. Diese Versuche liefern eine weitere Bestätigung für das, was oben bereits hervorgehoben wurde, daß nämlich das Kochen von Organmasse mit 2proz. Natronlauge keine Verseifung der Cholesterinester hervorruft. Ferner zeigt das Ergebnis des Versuchs 4, daß man sehr wohl die alkalische Lösung eine längere Zeit mit Äther in einem verschlossenen Kolben stehenlassen kann, ohne eine Verseifung der Cholesterinester oder eine andere Veränderung des freien oder gebundenen Cholesterins befürchten zu brauchen.

Da ich bei meinen oben angegebenen Untersuchungen Bestimmungen nur an zwei Arten von Organen, Leber und Niere, ausgeführt hatte, so war es von Bedeutung, das von mir angewandte Verfahren an anderen Substraten zu prüfen. Shimidzu fand, wie oben erwähnt, daß Kumagawa-Sutos Methode ein schlechtes Resultat bei Bestimmungen an Blut oder Serum ergab, und erhielt eine quantitative Extraktion nur durch Extraktion mit absolutem Alkohol nach einem Verfahren, über das ich auf S. 118 berichtet habe.

Um zu untersuchen, ob eine Behandlung mit 2proz. Natronlauge und darauffolgende Ätherextraktion der alkalischen Lösung zuverlässige Resultate auch bei Untersuchung von Blut gab, stellte ich einige Versuche an defibriniertem Ochsenblut an.

In zwei Versuchen benutzte ich mein gewöhnliches Verfahren mit halbstündigem Kochen des Blutes mit 2proz. Natronlauge; in zwei anderen Versuchen wurde zuerst eine Extraktion mit abs. Alkohol in der auf S. 118 angegebenen Weise ausgeführt, wobei die Extraktion mit kochendem abs. Alkohol 12 Stunden lang fortging. Hiernach wurde der Alkohol auf etwa 10 ccm Volumen eingedampft, 20 ccm 2proz. Natronlauge wurden hinzugesetzt und die Lösung auf kochendem Wasserbad $^1/_2$ Stunde lang stehengelassen, worauf die alkalische Lösung auf gewöhnliche Weise mit Äther extrahiert wurde. Diese nachfolgende Alkalibehandlung des Extrakts nach der Alkoholextraktion wurde vorgenommen, um ein reineres Extrakt zu erhalten; die Alkohol-

Digitized by Google

lösung war nämlich stark braungefärbt. Die Werte, die bei diesen vier Versuchen erhalten wurden, sind in Tabelle XI wiedergegeben.

Tabelle XI.

Blutmenge in g	Behandlung des Blutes	Versuch Nr.	Freies Cholesterin		Gebund. Cholesterin	
			Digitonincholesterid in mg	Cholesterin in mg	Digitonincholesterid in mg	Cholesterin in mg
15	Kochen mit 2% NaOH; Ätherextraktion der alkalischen Lösung	1	33,9	8,24	27,4	6,66
15		2	33,7	8,19	27,8	6,75
15	Zuerst Extraktion des Blutes mit absolutem Alkohol, danach Behandlung d. Extrakts mit 2% NaOH; Ätherextraktion der Lösung	3	33,6	8,16	27,7	6,73
15		4	33,8	8,21	27,5	6,68

Die Werte in obiger Tabelle XI, wo zwei der Versuche mit einer, zwei mit einer anderen Extraktionsbehandlung ausgeführt worden sind, zeigen, wie man sieht, eine gute Übereinstimmung, so daß es also als erwiesen angesehen werden kann, daß das von mir angewandte Verfahren ein ebenso gutes Resultat bei Blut ergibt wie die allgemein empfohlene Extraktion mit kochendem absoluten Alkohol.

Nach diesen Untersuchungen erachtete ich das von mir geprüfte Verfahren einer weiteren Anwendung wohl wert. Durch Behandlung von frischer Organmasse mit 2proz. Natronlauge und nachfolgende Ätherextraktion der alkalischen Lösung erzielt man eine quantitative Extraktion, und außerdem erhält man das Cholesterin und seine Ester ziemlich frei von Verunreinigungen sowie in einer solchen Form, daß sie sich quantitativ je für sich nach der Windausschen Digitoninmethode bestimmen lassen. Indessen ist, um gute Resultate bei den Bestimmungen zu erhalten, eine nicht unbedeutende Übung bei der Arbeit und vor allem große Genauigkeit bei der Ausführung der Bestimmungen erforderlich. Außerdem muß man darauf achten, daß nicht Stoffe, die eventuell durch Digitonin fällbare Bestandteile enthalten, mit den verwendeten Alkohol- oder Ätherlösungen in Berührung kommen. Es sind vor allem Korke und Gummiröhren, die hierbei in Betracht kommen. Sowohl Kork als Gummi enthalten solche Stoffe, weshalb Korke und Gummiröhren, wenn

Digitized by Google

sie angewandt werden müssen, vor der Benutzung gründlich mit Alkohol ausgekocht oder mehrere Tage lang mit Äther, der mehrmals gewechselt wird, extrahiert werden müssen. Korke zu Kolben können eventuell mit einem kleinen, ganzen Stanniolblatt umwickelt werden. Die Methode nimmt leider lange Zeit zur Ausführung in Anspruch, wenn man genau arbeiten will, und ich selbst, der ich doch recht große Übung darin erhalten habe, konnte nie mehr als höchstens drei vollständige Organbestimmungen in der Woche, gewöhnlich nicht mehr als zwei, ausführen.

Nach dieser Prüfung verschiedener Verfahren, teils quantitativ das Cholesterin und die Cholesterinester zu bestimmen, teils diese Stoffe aus den Organen zu extrahieren, glaube ich sagen zu können, daß ich den Forderungen habe genügen können, die ich im Beginn der methodologischen Abteilung dieser Arbeit an eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins und seiner Ester in Organen oder damit vergleichbaren Substraten stellte. Die Windaussche Digitoninmethode, nach Thaysens Vorschriften ausgeführt, gibt bei reinen Cholesterinlösungen Werte, die den Anforderungen wissenschaftlicher Exaktheit wohl genügen, und durch mein Verfahren, Kochen frischer Organmasse mit 2proz. Natronlauge und darauffolgende Ätherextraktion der alkalischen Lösung, erhält man eine quantitative Extraktion des im fraglichen Organ vorhandenen freien und als Ester gebundenen Cholesterins, und diese Stoffe werden in einer solchen Form erhalten, daß sie sich quantitativ mittels der Digitoninmethode bestimmen lassen.

III. Untersuchungen von Organen.

Untersuchungsmethode.

Das Material zu meinen Untersuchungen habe ich von Sektionen teils im Pathologischen Institut in Lund, teils im Malmöer Allgemeinen Krankenhaus her bezogen. Die hierbei entnommenen Organe, Leber, Nieren und Nebennieren, wurden so rasch wie möglich nach der Sektion in Arbeit genommen. Stücke von den Organen wurden in 10proz. Formalin fixiert, worauf die erforderliche Menge der Organe zermahlt und mit 2proz. Natron-

Digitized by Google

lauge behandelt wurde; sodann wurde die quantitative chemische Bestimmung des freien und des als Ester gebundenen Cholesterins in der oben geschilderten Weise ausgeführt.

Zu meinen mikroskopischen Untersuchungen benutzte ich Gefrierschnitte, teils wandte ich gewöhnliche Färbung mit Hämatoxylin van Gieson an, um mich über das allgemeine Aussehen des Präparats sowie das Vorkommen eventueller krankhafter Veränderungen zu orientieren, teils bediente ich mich der gewöhnlichen Färbungsmethoden zum Nachweis lipoider Substanzen in Gewebeschnitten, also Färbung mit Nilblausulfat und Sudan III, sowie Färbung nach der Smith-Dietrichschen und der Ciaccioschen Färbungsmethode.

Einen näheren Bericht über die Behandlung der Gefrierschnitte bei diesen verschiedenen Färbungsmethoden gebe ich hier nicht, sondern verweise betreffs technischer Einzelheiten auf Kawamuras[1]) Arbeit und auf Schmorl, Die pathologisch-histologischen Untersuchungsmethoden, 1918.

Ferner habe ich meine Schnitte auf das Vorkommen von doppelbrechenden Substanzen untersucht und mich hierbei einer Polarisationsvorrichtung von Zeiß mit in den Blendenträger des Beleuchtungsapparats am Mikroskop eingehängtem Polarisator und über dem Okular eingesetztem Analysator bedient.

Kawamura hat in seiner oben erwähnten Arbeit die Färbungsverhältnisse bei reinen Lipoiden und Lipoidmischungen sowie das Vorkommen oder Fehlen von Doppelbrechung untersucht und kam der Hauptsache nach zu den Resultaten, wie sie in der nachstehenden Tabelle wiedergegeben sind.

Bei Betrachtung der obigen Tabelle findet man, daß man mit Hilfe verschiedener Färbungsmethoden und durch Untersuchung der Präparate in polarisiertem Licht eine gewisse Möglichkeit besitzt, die verschiedenen Lipoide voneinander zu unterscheiden. Doch handelt es sich in dieser Tabelle um reine Lipoide oder Lipoidmischungen, und man kann sicherlich erwarten, daß in Schnittpräparaten die Verhältnisse komplizierter sind, denn in diesen kommen wahrscheinlich mehrere Lipoide gleichzeitig und in innigem Kontakt miteinander vor.

Was nun die Cholesterinester betrifft, so kommen sie in Gefrierschnitten von formalingehärtetem Material in Form von

[1]) Die Cholesterinesterverfettung. Jena 1911.

Digitized by Google

Tabelle XII. (Nach Kawamura.)

	Anisotropie in Glycerin	Nilblau	Sudan III	Smith-Dietrich	Ciaccio
Phrenosin aus Nebenniere	positiv	schwach bläulich	schwach gelblich-rötlich	schwarz	negativ
Sphingomyelin aus Nebenniere	„	„	gelbrot	braun bis schwarz	„
Lecithin	positiv, aber nicht viel	bläulich	gelblich-rötlich	„	„
Kephalin + Cholesterin	positiv	schwach bläulich	schwach gelblich-rot	schwarz	positiv
Cholesterinölsäuremischung	„	leicht rötlich	gelblich-rot	ungefärbt	„
Cholesterin mit Triglycerid. gemischt	negativ	blaurot	gelbrot	blau-schwarz	negativ
Cholesterin	„	leicht rötlich	„	ungefärbt	„
Cholesterinester	positiv	schwach rötlich	gelblich-rot	„	„
Glycerinester (Olivenöl)	negativ	rot	rot	„	„
Fettsäuren (Stearinsäure)	„	leicht rötlich oder leicht bläulich	gelblich-rötlich	schwarz	positiv

feinen, doppelbrechenden Krystallen vor. Diese Krystalle verlieren bei Erwärmung ihr Doppelbrechungsvermögen, bilden aber nach Abkühlung doppelbrechende Tropfen, die im Polarisationsmikroskop mit gekreuzten Nicols als leuchtende Tropfen mit einem dunklen Kreuz in der Mitte erscheinen. Die flüssigen Tropfen behalten in den Präparaten diesen Zustand bei gewöhnlicher Zimmertemperatur sehr lange Zeit hindurch bei.

Von den in obiger Tabelle angegebenen Stoffen zeigen außer Cholesterinester, Phrenosin und Sphingomyelin sowie Mischungen von Cholesterin mit Kephalin oder Ölsäure, Doppelbrechung in geeignetem Medium. Indessen bilden Phrenosin und Sphingomyelin nach Kawamuras Angabe nie Krystalle und besitzen, gleichwie auch das Kephalin, das Vermögen, Wasser aufzunehmen und Myelinfiguren zu bilden. Was Mischungen von Cholesterin mit Ölsäure betrifft, so können diese nach Erwärmung doppelbrechende Tropfen bilden, die jedoch nicht beständig sind, sondern sich bald in nadelförmige Krystalle umwandeln. Doch zeigt

Digitized by Google

nach Aschoff[1]) keiner von diesen Stoffen oder Mischungen die für die Cholesterinester typischen flüssigen Krystalle mit Kreuzfiguren, weshalb man also leicht die Cholesterinester von diesen anderen doppelbrechenden lipoiden Substanzen unterscheiden kann.

Ich will hier erwähnen, daß man in Gefrierschnitten sehr oft doppelbrechende nadelförmige Krystalle im Innern von Fetttropfen in den gewöhnlichen Fettzellen oder in fettreichen Leberzellen liegen sieht. Diese doppelbrechenden Krystalle verschwinden bei Erwärmung, bilden aber nicht doppelbrechende Tropfen, sondern nehmen nach Abkühlung ihre frühere Krystallform wieder an. Karwicka[2]) fand solche doppelbrechende Bildungen in Fettzellen im subcutanen Fettgewebe und im Knochenmark. Engstrand[3]) sah doppelbrechende Krystalle dieser Art in den Leberzellen bei Lebercirrhose und konnte in Mischungen von Triolein und Tripalmitin oder Tristearin ähnliche doppelbrechende Bildungen erhalten, die von ihm als im Triolein auskrystallisiertes Tripalmitin und Tristearin aufgefaßt wurden.

Ist demnach die doppelbrechende Eigenschaft der Cholesterinester und ihr Vermögen, flüssige Krystalle zu bilden, von ausschlaggebender Bedeutung für ihren Nachweis in Gewebeschnitten, so ist dagegen ihr Verhalten gegen verschiedene Färbungsmethoden von geringerer Bedeutung. Keine der gewöhnlichen Färbungsmethoden ergibt eine derartige Färbung der Cholesterinester, daß es leicht ist, sie von den übrigen Lipoiden zu unterscheiden, im Gegenteil werden die Cholesterinester, wenigstens bei gewöhnlicher Temperatur, sehr schwach sowohl von Sudan III als von Nilblausulfat gefärbt und von der Smith-Dietrichschen und der Ciaccioschen Färbungsmethode überhaupt nicht beeinflußt. Ferner kann die Färbung eines Präparats nach Smith-Dietrich den Nachteil mit sich bringen, daß andere Lipoide, die nach dieser Methode gefärbt werden, eine kräftige schwarze Farbe annehmen, die, wie Kawamura betont, die Cholesterinester verdecken kann, so daß diese nicht oder nur mangelhaft wahrgenommen werden können. Einen ähnlichen Effekt kann man durch kräftige Färbung mit Sudan III erhalten.

[1]) Zieglers Beiträge z. allg. Path. u. pathol. Anat. **47**, 1. 1910.
[2]) Zieglers Beiträge z. allg. Path. u. pathol. Anat. **50**, 437. 1911.
[3]) Hygiea **16**, 913. 1914.

Digitized by Google

Doch ist natürlich diesen Färbungsmethoden nicht der große Wert abzusprechen, den sie durch die Möglichkeit haben, sich betreffs des Vorkommens und der Beschaffenheit anderer Lipoide zu orientieren. Ein ziemlich gutes Resultat erhält man durch Färbung mit Nilblausulfat, das den Cholesterinestern eine schwache rosa Färbung verleiht und das außerdem die anderen Lipoide nicht allzu stark färbt, sondern die Cholesterinester deutlich im Polarisationsmikroskop hervortreten läßt.

Findet man in einem Schnitt bei mikroskopischer Untersuchung Lipoide, die doppelbrechende Krystalle bilden, welche nach Erwärmung und darauffolgender Abkühlung doppelbrechende Tropfen mit Kreuzfiguren bei gekreuzten Nicols bilden, so kann man also sicher sein, daß es sich um Cholesterinester handelt, wenigstens sind noch keine anderen Lipoide, die diese Eigenschaften besitzen, beschrieben worden.

Es erhebt sich sodann die Frage, wie man die Menge von Cholesterinestern in einem Schnittpräparat soll schätzen können und so möglicherweise zu einer Auffassung von dem quantitativen Gehalt des fraglichen Organs an Cholesterinestern gelangen kann. Hierbei muß man sicherlich in Betracht ziehen, daß nicht die ganze Menge Cholesterinester, die sich in einem Gewebe befindet, in sichtbarer Form vorkommt, sondern daß ein Teil derselben durch andere Stoffe in Lösung gehalten wird, ähnlich wie die Cholesterinester z. B. im Blutplasma in Lösung gehalten werden, und man hat ferner an die Möglichkeit zu denken, daß in verschiedenen Geweben und vielleicht auch in demselben Gewebe unter verschiedenen Bedingungen die Konzentration der Cholesterinester nicht dieselbe zu sein braucht, damit diese sozusagen auskrystallisieren und bei einer mikroskopischen Untersuchung nachgewiesen werden.

Karwicka hat versucht, zu einer Auffassung von dem Gehalt der Nebennieren an Cholesterin dadurch zu gelangen, daß er die doppelbrechenden Tropfen zählte, hat sich aber nicht darüber ausgesprochen, welcher Grad von Zuverlässigkeit diesem Verfahren zukommt. Auf den ersten Blick hin kann dieses Verfahren recht gut erscheinen. Indessen weiß ein jeder, der sich mit diesen Dingen beschäftigt hat, daß die doppelbrechenden Tropfen beträchtlich an Größe variieren, und da hinzukommt, daß die Cholesterinester, wie Kawamura gezeigt hat, von anderen Lipoiden um-

Digitized by Google

schlossen werden oder auch Hüllen um solche unter Beibehaltung ihres doppelbrechenden Vermögens bilden können, so ist leicht ersichtlich, daß es sehr schwer ist, durch Zählung der Anzahl der Tropfen in einem Schnittpräparat, ja, auch wenn deren Größe angegeben wird, zu einer einigermaßen sicheren Auffassung von dem quantitativen Gehalt an Cholesterinestern in dem dem Schnitte entsprechenden Organ zu gelangen. Ich bin daher überzeugt davon, daß eine auf ein solches Zählverfahren gegründete Untersuchung kein besseres Resultat ergeben kann als eine einfache Schätzung des Vorkommens von doppelbrechenden Tropfen in mehreren Schnitten des zu untersuchenden Organs.

Untersuchte Fälle.

Fall 1. A. B., 46jähriger Mann. Aufgenommen und gestorben 9. II. 1917. Sektion 10. II.

Klin. Diagnose: Unfall. Innere Blutung.

Pathol.-anat. Diagnose: Ruptura hepatis. Haemorrhagia in cav. peritonei. Innere Organe ohne krankhafte Veränderungen.

In den Nebennieren sehr reichlicher Gehalt an Cholesterinestern.

Fall 2. H. A., 20jähriger Mann. Aufgenommen 16. III. 1917; gestorben 17. III. 1917. Sektion 17. III.

Klin. Diagnose: Suicidium.

Pathol.-anat. Diagnose: Vulnus sclopetar. reg. temporal. dext. cum laceratione cerebri.

Keine krankhaften Veränderungen an den Organen des Körpers.

Die mikroskopische Untersuchung der Nieren zeigt ein normales Bild. In der Leber findet man eine diffuse, mäßige Fettanhäufung in den Zellen in Form kleiner Körnchen, die von Sudan rot, von Nilblausulfat blau gefärbt werden.

Die Nebennieren sind von gewöhnlicher Größe. Sie zeigen eines diffus reichliches Vorkommen von Lipoiden in sämtlichen Rindenschichten; davon überaus reichlich von Cholesterinestern.

Fall 3. A. J., 29jähriger Mann. Aufgenommen 25. III. 1917; gestorben 26. III. 1917. Sektion 27. III.

Klin. Diagnose: Fractura complicata cranii + Contusio cerebri.

Pathol.-anat. Diagnose: Fractura cranii, costarum et femoris dext. + Laceratio et ruptura intest. tenui c. peritonit. acuta.

Leber, Nieren und Nebennieren ohne krankhafte Veränderungen. Mikroskopische Untersuchung der Nieren zeigt nichts Abnormes. In der Leber findet man eine Anhäufung von Neutralfett, rotgefärbt von Nilblausulfat, in großen Tropfen in den Zellen dicht an den Zentren der Acini, mehr peripherwärts sind die Tropfen kleiner. In den Fetttropfen finden sich doppelbrechende Krystalle, die bei Erwärmung verschwinden, nach Abkühlung aber in ihrer früheren Form wiederkehren.

Digitized by Google

Die Nebennieren, die von gewöhnlicher Größe sind, zeigen ein reichliches Vorkommen von Lipoiden in der Rinde. Die Lipoide sind ziemlich gleichmäßig verteilt und kommen in sämtlichen Schichten vor. Cholesterinester in sehr reichlicher Menge.

Fall 4. E. H., 30jährige Frau. Gestorben 30. III. 1917. Gerichtsärztliche Obduktion 2. IV. 1917.

Pathol.-anat. Diagnose: Erstickung.

Keine krankhaften Veränderungen innerer Organe.

Die Nieren mikroskopisch ohne pathologische Veränderungen.

In der Leber finden sich diffus vorkommend lipoide Körnchen in den Zellen; sie werden von Sudan rot, von Nilblau blau gefärbt.

Die Nebennieren mäßig groß. Gewöhnliches Vorkommen von Lipoiden, vielleicht relativ gering in der Zona glomerulosa.

Cholesterinester in überaus reichlicher Menge.

In der Aorta hier und da kleine Verdickungen der Intima mit elastischer Hyperplasie und Ablagerung von Lipoiden, die von Nilblau blauviolett gefärbt werden; darunter Cholesterinester.

Fall 5. J. E., 67jähriger Mann. Aufgenommen 23. IV. 1917; gestorben 27. IV. 1917. Sektion 28. IV.

Klin. Diagnose: Fractura vertebr. cervic. + Laceratio medullae spinalis.

Pathol.-anat. Diagnose: Fractura vert. cervic. VI + Contusio medullae spinalis.

Herz ohne Besonderheiten. Die Lungen ödematös, im übrigen normal.

Die Leber makroskopisch ohne krankhafte Veränderungen. Die Nieren sind normal groß und von gewöhnlicher Festigkeit. Die Nierenoberfläche ist eben. Die Rinde ist teilweise etwas schmal, mit undeutlicher Zeichnung; keine sichere Trübung der Labyrinthe. — Die Nebennieren von gewöhnlicher Größe, vereinzelte sog. Adenome. — Die Aorta zeigt leichte arteriosklerotische Veränderungen in Form von gelbweißen Intimaverdickungen.

In der Leber findet man bei mikroskopischer Untersuchung eine mäßige Lipoidanlagerung in Form kleiner Tropfen, die von Nilblau rot oder blauviolett gefärbt werden. — In den Nieren werden hier und da in der Nähe der Nierenoberfläche kleine Narbenbildungen mit mäßiger Rundzelleninfiltration angetroffen. Im übrigen nichts Bemerkenswertes. In den Nebennieren reichliche Mengen Lipoide in sämtlichen Schichten der Rinde. Cholesterinester in sehr reichlicher Menge.

Fall 6. E. B., 51jährige Frau. Aufgenommen 23. VIII. 1916; gestorben 2. IX. 1916. Sektion 4. IX.

Klin. Diagnose: Coma diabeticum.

Pathol.-anat. Diagnose: Atrophia mitior pancreatis + Degeneratio parench. renum + Arteriosclerosis.

Herz nicht vergrößert. In der Aorta finden sich überall gelbe und grauweiße erhabene arteriosklerotische Flecke, am zahlreichsten unten, wo auch mehrere atheromatöse Geschwüre vorhanden sind. Starke arteriosklerotische Veränderungen in den Coronararterien. — Die Leber vergrößert,

Digitized by Google

schlaff, blaßbraun mit sehr deutlicher Zeichnung. — Die Nieren etwas vergrößert, sehr schlaff. Der Schnittrand ist schwellend, und die Rinde zeigt vermehrte Breite. In den Sepimenten sieht man zahlreiche grauweiße, opake Körner und Züge. — Das Blut bildet an der Oberfläche nur eine schwach hervortretende Lipoidschicht. — Nebennieren ohne Besonderheiten.

Die mikroskopische Untersuchung der Nieren zeigt ausgebreitete Parenchymdegeneration und Nekrose in den Hauptstücken der Nierenkanäle, aber keine anderen Veränderungen. — Leber und Nebennieren wurden nicht mikroskopisch untersucht.

Fall 7. N. S., 42jähriger Mann. Aufgenommen 24. III. 1917; gestorben 27. III. 1917. Sektion 27. III.

Klin. Diagnose: Coma diabeticum + Phlegmone colli.

Pathol.-anat. Diagnose: Atrophia pancreatis + Phlegmone colli + Degeneratio parenchymatosa renum.

Herz nicht vergrößert, schlaff. In der Aorta unbedeutende arteriosklerotische Veränderungen. — Die Leber zeigt gewöhnliches Aussehen. — Die Nieren sind sehr schlaff, und die Rinde ist stark trübe. — Das Blut setzt keine Schicht von Lipoiden ab.

Die Leber zeigt mikroskopisch eine recht reichliche Menge Neutralfett in Form von großen Tropfen sowie andere Lipoide kleine Tropfen bildend, die von Nilblausulfat violett gefärbt werden.

Die Nieren zeigen eine bedeutende degenerative Beeinflussung der Epithelien der gewundenen Kanälchen. Die geraden Kanälchen und die Glomeruli ohne Besonderheiten. Reichliche Mengen Fettsubstanzen in den Epithelien der gewundenen Kanälchen. Das Fett liegt basal in den Zellen und wird von Sudan III rot, von Nilblausulfat blauviolett und nach Smith-Dietrich schwarz gefärbt. Zwischen diesen Fettsubstanzen sieht man kleine doppelbrechende Krystalle; doch findet man nirgends doppelbrechende Tropfen nach Erwärmung und darauffolgender Abkühlung.

Die Nebennieren sind recht schmal, jedoch ungefähr von gewöhnlicher Größe. Die Rinde ist sehr arm an Lipoiden, und diese kommen nur stellenweise in den verschiedenen Rindenschichten vor. Cholesterinester sehr spärlich.

Fall 8. A. F., 45jährige Frau. Aufgenommen 11. XI. 1916; gestorben 29. XI. 1917. Sektion 29. I. 1918.

Klin. Diagnose: Anaemia gravis.

Pathol.-anat. Diagnose: Anaemia gravis.

Reichlicher Ascites. Mäßiger Hydrops in Herz und Brustfell.

Herz normal. Lungen ödematös.

Die Leber ist mäßig groß mit klarer Zeichnung. Oberfläche und Schnittfläche intensiv braun. — Nieren normalgroß, ihr Parenchym blaß. — Nebennieren normalgroß. — In der Aorta deutliche arteriosklerotische Veränderungen.

Die Leber zeigt mikroskopisch eine mäßige Rundzelleninfiltration in dem portalen Bindegewebe. In den Leberzellen Lipoide in Form kleiner Tropfen. — Die Nieren mikroskopisch ohne krankhafte Veränderungen. Fettfärbung gibt negatives Resultat.

Digitized by Google

In den Nebennieren sehr reichlich Lipoide und außerordentlich reichlich Cholesterinester.

Fall 9. J. N., 34jährige Frau. Aufgenommen 2. I. 1917; gestorben 12. III. 1917. Sektion 12. III.

Klin. Diagnose: Anaemia perniciosa.

Pathol.-anat. Diagnose: Anaemia gravis.

Verfettung der Herzmuskulatur mit stark ausgesprochener Tigrierung. — Leber mäßig groß, ziemlich braun. — Die Nieren zeigen eine klare etwas gelbbraune Schnittfläche. — In der Aorta eine fast citronengelbe Fettanlagerung in der Intima.

Die Leber zeigt mikroskopisch stark erweiterte zentrale Capillaren und Untergang der Leberzellen in den zentralen Teilen der Acini. Hier findet man auch eine recht reichliche Menge großer Tropfen von Neutralfett in den erhaltenen Zellen. — Die Nieren zeigen eine geringe Trübung der Epithelien der gewundenen Kanälchen. Keine Fettanhäufung dort, in den geraden Kanälchen aber sieht man Fett in geringer Menge.

Die Nebennieren sind von gewöhnlicher Größe. Sie enthalten eine sehr geringe Menge Lipoide und sehr wenig Cholesterinester.

In der Aorta recht ausgebreitete arteriosklerotische Veränderungen mit reichlicher Ablagerung von Lipoiden in der Intima, darunter reichlich Cholesterinester.

Fall 10. A. M., 40jähriger Mann. Aufgenommen 10. II. 1917; gestorben 15. II. 1917. Sektion 15. II.

Klin. Diagnose: Cirrhosis hepatis.

Pathol.-anat. Diagnose: Cirrhosis hepatis + Ascites + Ikterus + Varix. ruptur. oesophag.

Die Leber ist klein, ihre Oberfläche überall höckerig und uneben. Auf der Schnittfläche überall braungrüne, bis zu erbsengroße Parenchyminseln, umgeben von einem graulichen, festen Bindegewebe. — Die Nieren sind etwas groß. Die Rinde ist recht breit und das Gewebe nicht völlig klar. — Die Nebennieren von gewöhnlicher Größe, mit citronengelber Rinde. Deutliche Arteriosklerose in der Aorta.

Die Leber zeigt mikroskopisch Inseln von Leberzellen zwischen großen, groben Zügen von Bindegewebe, das stark von Rundzellen durchsetzt ist. Reichliche Neubildung von Gallencapillaren. Die Leberzellen enthalten große Tropfen von Lipoiden, hauptsächlich in Form von Neutralfett, die von Nilblausulfat rot gefärbt werden. In diesen Fetttropfen finden sich doppelbrechende Krystalle, die jedoch nicht Cholesterinester sind. In den Kupfferschen Sternzellen sind keine Lipoide vorhanden.

Die gewundenen Kanälchen der Nieren hier und da recht weit, mit körnigem Inhalt sowie Gallenpigment angefüllt. Glomeruli normal. Fettfärbung negativ.

In den Nebennieren herdförmig Anhäufung von Lipoiden, hauptsächlich in der Zona fasciculata. Recht wenig Cholesterinester ist vorhanden, an den Stellen lokalisiert, wo andere Lipoide vorhanden sind.

Fall 11. K. J. A., 51jähriger Mann. Aufgenommen 7. XI. 1917; gestorben 17. XI. 1917. Sektion 17. XI.

Digitized by Google

Klin. Diagnose: Cirrhosis hepatis.

Pathol.-anat. Diagnose: Cirrhosis atroph. hepatis.

Deutlicher Ikterus. Ascites und Hydrothorax. — Herz schlaff ohne Klappenveränderungen. Mäßige Arteriosklerose in der Aorta.

Die Leber ist beträchtlich verkleinert. Ihre Oberfläche braungelb, kleinhöckerig. Auf der Schnittfläche sieht man erhabene, hanfkorngroße graugelbe Inseln von Leberparenchym und dazwischen recht schmale Züge von graurotem oder grauem, festem Bindegewebe. — Die Nieren sind etwas groß und schlaff. Der Schnittrand nicht schwellend, das Parenchym nicht trübe. Die Nebennieren von gewöhnlicher Größe, makroskopisch ohne krankhafte Veränderungen.

Die Leber zeigt mikroskopisch Inseln von Leberzellen, umschlossen von einem reichlich rundzelleninfiltrierten Bindegewebe. Nur sehr spärliche Neubildung von Gallencapillaren. In den Leberzellen spärlich Lipoide, die in Form von feinen Tröpfchen vorkommen. Keine doppelbrechenden Substanzen sichtbar. Die Kupfferschen Sternzellen zeigen keine lipoiden Substanzen.

Die gewundenen Kanälchen der Nieren recht weit und mit körnigem Inhalt angefüllt. Glomeruli normal. Diffuse Vermehrung des interstitiellen Bindegewebes, jedoch ohne Rundzelleninfiltration. Die Epithelien der Kanälchen überall reich an Fettsubstanzen, die in Form kleiner, feiner Körner abgelagert sind; diese werden von Sudan rot, von Nilblausulfat blau und nach Smith-Dietrich blauschwarz gefärbt. Von den Fettsubstanzen zeigt ein Teil Doppelbrechung, bei Erwärmung und darauf folgender Abkühlung sieht man aber keine doppelbrechenden Tropfen mit Kreuzfiguren.

In der Nebenniere recht reichlich Lipoide, die jedoch stellenweise auftreten. Stellenweise Cholesterinester in mäßiger Menge.

Fall 12. A. B., 37jähriger Mann. Aufgenommen 5. XI. 1916; gestorben 23. XI. 1916. Sektion 23. XI.

Klin. Diagnose: Nephritis interstitialis chronica.

Pathol.-anat. Diagnose: Nephritis chron. parench. et interstit. + Hypertrophia et dilatatio cordis + Arteriosclerosis + Haemorrhagia capsulae int. bilat. cerebri et pontis + Bronchopneumonia et Infarct. pulmonum amborum.

Linke Herzkammer hypertrophisch, ihre Wand mißt an der Basis 2 cm. Mäßige Arteriosklerose in der Aorta, aber ziemlich starke arteriosklerotische Veränderungen in den größeren Arterien des Gehirns. — Die Leber vergrößert und schlaff; Zeichnung deutlich. — Die Nieren sind ziemlich vergrößert und schlaff. Die Kapsel läßt sich leicht ablösen. An der Nierenoberfläche sieht man zahlreiche, seichte Einsenkungen mit rotem Grunde. Die Rinde ist breiter als normal, schwellend. Die Zeichnung getüpfelt mit roten und graugelben Flecken und Zügen.

In der Leber werden bei mikroskopischer Untersuchung reichlich große Fettkugeln in den Leberzellen hauptsächlich in den peripheren Teilen der Acini angetroffen. Das Fett wird von Nilblausulfat rot gefärbt, durch die Smith-Dietrichsche Färbung nicht beeinflußt. In diesen

Digitized by Google

Fetttropfen sieht man kleine, feine doppelbrechende Krystalle, die nach Erwärmung nicht in doppelbrechende Tropfen übergehen. Keine Cholesterinester sichtbar.

Die Nieren zeigen mikroskopisch eine starke Verdickung und Sklerosierung der Gefäßwände besonders in den Vasa afferentia und efferentia, die teilweise fast obliteriert sind. In den Interstitien sieht man eine in Form von Zügen auftretende Rundzelleninfiltration und Bindegewebszunahme, letztere mehrorts besonders stark um die Glomeruli herum. Diese letzteren zeigen eine deutliche intracapillare Zellenproliferation, hier und da mit hyalin umgewandelten Schlingen. Zahlreiche Glomeruli sind sklerosiert. Die gewundenen Kanälchen sind stellenweise ganz zerstört; wo sie noch vorhanden, sind sie erweitert und mit körnigem Inhalt angefüllt. In den geraden Kanälchen reichlich desquamierte Epithelien und hyaline Zylinder. Die Epithelien der Kanälchen enthalten nur spärlich Lipoide, am meisten jedoch in den geraden Kanälchen. In den Epithelien der gewundenen Kanälchen hier und da doppelbrechende Cholesterinester in sehr geringer Menge. Die veränderten Gefäße zeigen eine recht reiche Ablagerung von Lipoiden, darunter Cholesterinester in sehr geringer Menge.

Die Nebennieren von gewöhnlicher Größe und mit gewöhnlicher Breite der Rinde. Sie zeigen mikroskopisch ein fast diffuses, sehr reichliches Vorkommen von Lipoiden, die von Nilblau violett, nach Smith-Dietrich schwarz gefärbt werden. Überaus sehr reichliches Vorkommen von Cholesterinestern.

Fall 18. A. L., 34jährige Frau. Aufgenommen 12. I. 1917; gestorben 15. I. 1917. Sektion 15. I.

Klin. Diagnose: Nephritis acuta parenchymatosa.

Pathol.-anat. Diagnose: Nephritis subacuta.

Spärliches Ödem der Unterschenkel. Hydrothorax. Linksseitige Hypertrophie des Herzens. — Aorta ohne Besonderheiten. — Die Leber ist beträchtlich vergrößert und schlaff. Das Parenchym ziemlich brüchig. Deutliche Zeichnung, bestehend aus grauen Acinusperipherien und dunklen, leicht eingesenkten Zentren. — Die Nieren sind etwas vergrößert und von fast normaler Konsistenz. Die Kapsel ist dünn und leicht abzulösen. Die Nierenoberfläche eben mit spärlichen kleinen Blutungen. Die Rinde schwillt deutlich auf der Schnittfläche und besitzt eine Breite von 10—12 mm. Sie zeigt im allgemeinen eine deutliche Zeichnung, die roten Streifen aber zwischen den Sepimenten sind auffallend breit. Die gewundenen Kanälchen sind auf mehreren ziemlich großen Gebieten stark opak und von einer grauen oder graugelben Farbe. Mark und Nierenbecken ohne Besonderheiten. — In der Leber findet man bei mikroskopischer Untersuchung mit gewöhnlicher Färbung nichts Abnormes. Bei Fettfärbung treten in sehr spärlicher Zahl Fetttropfen hervor, die von Nilblausulfat rot gefärbt werden, sowie in reichlicher Menge kleine, feine Lipoidkörnchen. Keine doppelbrechenden Substanzen werden angetroffen. — Mikroskopische Untersuchung der Nieren zeigt die Gefäßschlingen in den Glomeruli vergrößert und angeschwollen mit bedeutend vermehrtem Zellenreichtum. In der Bowmanschen Kapsel Eiweiß sowie hier und da rote Blutkörperchen. Die Epi-

Digitized by Google

thelien der Hauptstücke ziemlich niedrig. In den Kanallumina überreichlich Eiweiß; an mehreren Stellen sieht man Blutkörperchenzylinder. In den Interstitien hier und da Blutungen und vereinzelte Rundzelleninfiltrate. In sehr spärlicher Anzahl kleine Lipoidkörner in den Epithelien, hauptsächlich in den geraden Kanälchen. Hier und da doppelbrechende Tropfen mit Kreuzfiguren. — Die Nebennieren normal groß. Sie zeigen eine starke Anhäufung von Fettsubstanzen, die auf gewöhnliche Weise Farbe annehmen. Das Vorkommen von Lipoiden ist diffus und sehr reichlich in sämtlichen Schichten der Rinde. Cholesterinester in überaus sehr reichlicher Menge.

Fall 14. E. E., 38jährige Frau. Aufgenommen 1. II. 1917; gestorben 6. III. 1917. Sektion 8. III.

Klin. Diagnose: Degeneratio amyloidea renum.

Pathol.-anat. Diagnose: Hypernephroma malignum cum metastat. pulmonum + Degeneratio amyloid. organ. + Degeneratio parench. chron. renum (Nephrosis).

Herz nicht vergrößert. — Keine Arteriosklerose. — Leber deutlich vergrößert, etwas teigig. Die Leberacini zeigen eine breite periphere gelbe Zone und dunkles Zentrum, aber kein dazwischenliegendes Gebiet von grauem, durchsichtigem Gewebe.

Die rechte Niere ist deutlich vergrößert und sehr schlaff. Ihre Kapsel ist leicht abzulösen und die Oberfläche ist eben. Ihre Schnittfläche zeigt ein breites Parenchym mit deutlicher Grenze zwischen Rinde und Mark. Die Rinde ist breit und deutlich schwellend. Die Zeichnung derselben tritt gut hervor, und man nimmt ein halbdurchsichtiges graues Gewebe wahr, in welchem sich zahlreiche gelbweiße Körner und Streifen stark markieren. Nirgends Blutungen. — Am Platze der linken Niere trifft man eine doppelt faustgroße, runde und feste Geschwulst an, welche beim Durchschneiden sich als breit mit dem Rücken der linken Niere zusammenhängend erweist. Auf diesem ganzen Gebiet ist die Rinde der Niere verschwunden, und man sieht vereinzelte Geschwulstknoten noch weiter in die Niere eindringen. Die erhaltenen Teile der linken Niere scheinen ungefähr $^2/_3$ des Volumens dieser Niere zu entsprechen, und sie weisen dieselben Charaktere wie die rechte Niere auf.

Die Leber wurde nicht zu mikroskopischer Untersuchung aufgehoben.

Die Nieren zeigen bei mikroskopischer Untersuchung bedeutende degenerative Erscheinungen in den Epithelien der Kanälchen hauptsächlich der Hauptstücke, und man findet eine reichliche hyaline tropfenförmige Umwandlung. Die Glomeruli zeigen eine mäßige Amyloidumwandlung, sind aber im übrigen unverändert. Die Arterien der Nieren normal. Die Epithelien der gewundenen Kanälchen zeigen eine reichliche basale Lipoidanhäufung, und unter diesen Lipoidtröpfchen finden sich ziemlich reichlich Cholesterinester.

Die Nebennieren sind im wesentlichen normal, möglicherweise von etwas vermehrter Konsistenz. Sie zeigen mikroskopisch ein mäßiges Vorkommen von Lipoiden, die auf gewissen Gebieten in reichlicherer, auf anderen in geringerer Menge vorhanden sind. Wo die Lipoide vorkommen,

Digitized by Google

sind sie ungefähr gleichmäßig in den verschiedenen Schichten verteilt. Cholesterinester kommen in mäßiger Menge und in derselben Weise wie die anderen Lipoide vor, an gewissen Stellen mehr, an anderen weniger.

Fall 15. A. L., 39jährige Frau. Aufgenommen 27. III. 1917; gestorben 16. VI. 1917. Sektion 16. VI.

Klin. Diagnose: Otitis med. chron. op. + Abscessus cerebri.

Pathol.-anat. Diagnose: Glomerulonephritis chron. c. exacerbatione.

Herz schlaff, nicht vergrößert. — In der Aorta unbedeutende arteriosklerotische Veränderungen. — Leber ohne Besonderheiten.

Die Nieren von ungefähr anderthalbfacher normaler Größe. Sie fühlen sich gespannt, kissenförmig an. Die Rinde schwillt etwas und ist breiter als normal sowie von einem speckigen grauweißen Aussehen mit sehr undeutlicher Zeichnung.

Die Leber zeigt mikroskopisch nichts Bemerkenswertes. In den Nieren trifft man überall stark veränderte Glomeruli an mit starker Zellenproliferation in der Bowmanschen Kapsel, schöne „Halbmonde" bildend, die die Glomerulischlingen komprimieren. Alle Übergänge finden sich von unbedeutender bis zu sehr starker Zellenproliferation dieser Art. Die Glomerulischlingen hier und da hyalinisiert. Die gewundenen Kanälchen sind weit, mit Eiweiß angefüllt; ihre Epithelien niedrig. Atrophische Kanälchen sind ziemlich reichlich vorhanden. Das interstitielle Bindegewebe ist vermehrt, hier und da mit kleineren Rundzelleninfiltraten. Die Arterien zeigen mäßige Intimaverdickungen, jedoch nicht besonders in den feineren Arterien. Hier und da findet sich Blut in den Kanälchen. In den Interstitien vereinzelte Blutungen. Die Epithelien der gewundenen Kanälchen enthalten Lipoide in geringer Menge, jedoch nur in vereinzelten Kanälchen. Unter den Lipoiden vereinzelte doppelbrechende Körperchen mit Kreuzfiguren.

Die Nebennieren von normaler Größe. Hauptsächlich in der Zona fasciculata kommen Lipoide diffus in reichlicher Menge vor. Cholesterinester reichlich.

Fall 16. E. S., 39jährige Frau. Aufgenommen 31. X. 1917; gestorben 1. XI. 1917. Sektion 2. XI.

Klin. Diagnose: Pyosepticaemia ex periostit. alveol.

Pathol.-anat. Diagnose: Abscessus gland. submaxill. + Pneumonia lobular. lob. inf. pulm. sin. + Degeneratio parench. cordis + Degeneratio parench. renum.

Nieren von ungefähr der anderthalbfachen normalen Größe, schlaff. Auf dem Schnitt sieht man die Rinde stark schwellen; sie hat eine gelbgraue Farbe mit reichlichen punktförmigen Blutungen.

Mikroskopisch erweisen sich die Epithelien der gewundenen Kanälchen als stark degenerativ beeinflußt. Die Glomeruli und die geraden Kanälchen unverändert. Keine Fettanhäufung vorhanden.

Leber und Nebennieren wurden nicht untersucht.

Fall 17. K. V., 33jährige Frau. Aufgenommen 22. X. 1917; gestorben 16. XI. 1917. Sektion 17. XI.

Klin. Diagnose: Nephritis post gravidit. sive chron. interstit. c. haemorrhagia cerebri in partum.

Digitized by Google

Pathol.-anat. Diagnose: Glomerulonephritis + Hypertrophia ventr. sin. cordis + Haemorrhagia cerebri.

Starke Ödeme der Unterschenkel. — Linke Herzkammer hypertrophisch. — Beträchtliche arteriosklerotische Veränderungen in der Aorta mit ausgebreiteten gelbweißen Intimaverdickungen. — Leber etwas groß, im übrigen ohne Besonderheiten. — Linke Niere ungefähr normal groß, rechte etwas kleiner. Die Nierenkapsel läßt sich leicht ablösen; es zeigt sich eine feingrubige, gelbflammige Nierenoberfläche. Die Rinde ist teilweise von normaler Breite, teilweise etwas schmäler; an den erstgenannten Stellen ist das Gewebe gelb mit Massen von dunkelroten Punkten, an den letzteren ist es mehr graugelb.

In der Leber werden bei mikroskopischer Untersuchung reichlich Fettsubstanzen teils als große, teils als feine Tropfen angetroffen. Die großen Fetttropfen werden von Nilblausulfat rot, die feinen dunkelblau gefärbt. Die Fettanhäufung in den Leberzellen ist am stärksten in den Peripherien der Acini. Keine doppelbrechenden Lipoide anzutreffen.

Die Nieren zeigen mikroskopisch bedeutende Veränderungen. Es finden sich in reichlicher Menge untergegangene Glomeruli, und die erhaltenen sind mehr oder weniger zellenreich, hier und da mit roten Blutkörperchen in den Kapsellumina. An anderen Stellen sieht man mehr oder weniger reichliche Proliferation des Kapselepithels mit Bildung von „Halbmonden", und die Glomerulischlingen sind teilweise hyalinisiert. Die gewundenen Kanälchen sind weit, mit körnigem Inhalt angefüllt, ihr Epithel niedrig. Atrophische Kanälchen sind in reichlicher Menge vorhanden. Die Arterien, besonders die feineren, zeigen bedeutende Intimaverdickungen, und zahlreiche kleine Arterien sind vollständig obliteriert. Ziemlich diffuse Bindegewebsvermehrung mit Rundzelleninfiltraten hier und da. — In einem großen Teil der gewundenen Kanälchen findet sich eine Anhäufung von Lipoiden in den Epithelien. Die Fettsubstanzen werden von Nilblausulfat blau gefärbt. Außerdem sieht man mit Nilblau schwach rotgefärbte doppelbrechende Krystalle mit den Eigenschaften der Cholesterinester. Die Cholesterinester kommen reichlich teils in den Epithelien selbst, teils in den Kanälchenlumina unter den körnigen Massen daselbst vor. Ferner sieht man sie in den Glomeruli hauptsächlich im Kapselepithel, aber auch hier und da in geringer Menge in den hyalinisierten Glomerulischlingen; diese letzteren sind übrigens recht reich an anderen Fettsubstanzen. Die obliterierten Arterien enthalten reichlich Lipoide, die sich mit Nilblausulfat rot und blau färben; hier Cholesterinester in geringer Menge. In den Interstitien findet man Cholesterinester abgelagert teils in kleinen, auch mit anderen Lipoiden reichlich versehenen ovalen Zellen (Endothelzellen?), teils in recht großen, runden oder ovalen Bildungen ohne deutliche Zellenbestandteile, in denen nur Cholesterinester, aber keine anderen Lipoide vorhanden zu sein scheinen.

Die Nebennieren von gewöhnlicher Größe. Diffuses, reichliches Vorkommen von Lipoiden in sämtlichen Schichten der Rinde. Cholesterinester in sehr reichlicher Menge, mit den anderen Lipoiden zusammenliegend.

Digitized by Google

Fall 18. J. J., 5jähriger Knabe. Aufgenommen 16. XI. 1917; gestorben 21. XI. 1917. Sektion 22. XI.

Pathol.-anat. Diagnose: Croup.

Pathol.-anat. Diagnose: Pharyngitis, laryngitis et tracheitis diphtherica + Bronchopneumonia lob. sup. et inf. pulm. dxt. + Degeneratio myocardii + Glomerulonephritis acuta.

Nieren normal groß. Reichlich punktförmige Blutungen unter der Kapsel. Der Schnittrand etwas schwellend. Die Schnittfläche ist graugelb mit eingestreuten zahlreichen roten Bluttüpfelchen. — Die Leber ohne deutliche Veränderungen. Mikroskopisch zeigt sie überall Fettsubstanzen in Form sehr kleiner Körnchen.

In den Nieren findet man bei mikroskopischer Untersuchung keine Vergrößerung der Glomeruli; die Glomerulusschlingen sind nicht mit Blut angefüllt und erscheinen wie kollabiert. Keine Zellenvermehrung in den Glomeruli. In den Kapsellumina finden sich rote Blutkörperchen und Eiweiß. Die gewundenen Kanälchen enthalten eine geringe Menge Eiweiß sowie hier und da Blut. Das Kanälchenepithel zeigt keine deutlichen Veränderungen. Die Interstitien normal. Fettfärbung ergibt negatives Resultat. Keine doppelbrechenden Substanzen vorhanden.

Die Nebennieren zeigen mikroskopisch kleinere Blutungen im Mark. Die Rinde ist von gewöhnlichem Aussehen, der Lipoidgehalt ist aber spärlich und diffus zerstreut. Cholesterinester kommen in ziemlich reichlicher Menge vor.

Fall 19. E. L., 32jähriger Mann. Aufgenommen 3. X. 1917; gestorben 24. XI. 1917. Sektion 26. XI.

Klin. Diagnose: Nephritis chron. interstit. + Uraemia.

Pathol.-anat. Diagnose: Nephritis chron. c. induratione + Pleuritis et pericarditis serofibrinosa + Hypertrophia ventr. sin. cordis.

Deutliche linksseitige Herzvergrößerung. — In der Aorta vereinzelte gelbweiße Intimaverdickungen.

Leber normal groß, ohne deutliche Veränderungen.

Die Nieren sind kaum mehr als halb so groß wie normal und fühlen sich beträchtlich fest an. Die Rinde ist schmäler als gewöhnlich und mißt nur 2 mm in der Breite. Die gewöhnliche Rindenzeichnung ist verschwunden, statt dessen sieht man opake, gelbweiße, kleine Punkte und Züge, umgeben von einem blaß grauroten Gewebe. Die Kapsel läßt sich nur mit großer Schwierigkeit ablösen, und die Nierenoberfläche darunter ist überall körnig und uneben.

Die Nebennieren sind ziemlich groß. Auf ihrer Oberfläche sieht man reichlich kleine, gelbe, über stecknadelkopfgroße, runde, sich vorwölbende Bildungen. Die Rinde ist ausgesprochen citronengelb.

Die Leber zeigt mikroskopisch eine kleintropfige Fettanhäufung in den Leberzellen, hauptsächlich lokalisiert in den zentralen Teilen der Acini. Die Fettsubstanzen werden von Nilblausulfat dunkelblau gefärbt.

In den Nieren findet man einen sehr starken Untergang von Glomeruli. Die noch vorhandenen sind recht groß mit plumpen, mehr oder weniger hyalinisierten Schlingen. In den Kapsellumina finden sich Eiweiß sowie

Digitized by Google

hier und da vereinzelte rote Blutkörperchen. Die gewundenen Kanälchen, die meistens in inselförmigen Bildungen zusammenliegen, sind weit, mit niedrigen Epithelien und angefüllt mit körnigem Inhalt. Hier und da Blut in den Kanälchen. Das Bindegewebe beträchtlich vermehrt, zellenreich; in demselben liegen eingebettet sklerosierte Glomeruli und atrophische Kanälchen. Die kleinen Nierenarterien wie auch die größeren zeigen bedeutende Intimaverdickungen, und man sieht nicht wenige obliterierte kleine Arterien. In auf Fett gefärbten Präparaten sieht man in den Kanälchenepithelien eine mäßige Anhäufung von Lipoiden, ebenso in den veränderten Gefäßen. An diesen Stellen auch Cholesterinester in mäßiger Menge. Ferner findet man diese letzteren in den Interstitien teils ohne deutliche Beziehung zu Zellen liegend, teils in Zellen, die am ehesten Endothelien ähneln. Diese zeigen außerdem eine Anhäufung von anderen Lipoiden.

In den Nebennieren findet man ein diffuses Vorkommen von Lipoiden in ziemlich reichlicher Menge in der Zona glomerulosa und fasciculata, dagegen ist die Zona reticularis sehr arm an Lipoiden. Entsprechend den anderen Lipoiden finden sich Cholesterinester in ziemlich reichlicher Menge.

Fall 20. S. F., 20jähriger Mann. Aufgenommen 15. I. 1918; gestorben 21. I. 1918. Sektion 22. I.

Klin. Diagnose: Intoxicatio chloret. hydrargyr.

Pathol.-anat. Diagnose: Intoxicatio chloret. hydrargyr. + Enterocolitis diphtherica + Nephrosis renum + Pneumonia aspirat. pulm. amb.

Die Leber ist etwas vergrößert, schlaff; ihr Parenchym ist graubraun, trübe.

Die Nieren sind etwas vergrößert, sehr schlaff. Die Rinde schwillt stark; ist von grauweißer Farbe, trübe und opak. Die Nierenoberfläche ist eben.

Die Nebennieren von ungefähr normaler Größe, die Rinde grauweiß, das Mark von gewöhnlichem Aussehen.

Die Leber wurde nicht mikroskopisch untersucht.

Die Nieren zeigen bei mikroskopischer Untersuchung sehr starke Veränderungen der gewundenen Kanälchen. Diese sind mit abgestoßenen nekrotischen Epithelien angefüllt, und nur ganz an der Peripherie der Kanälchen findet man Epithelien, die eine kräftige Kernfärbung zeigen; sie sind indessen niedrig, endothelähnlich. Nirgends finden sich hyaline Tropfen in den Epithelien. Die Glomeruli und die geraden Kanälchen ohne deutliche Veränderungen. Die Interstitien normal. Fettfärbung ergibt negatives Resultat. Keine doppelbrechenden Substanzen vorhanden.

Die Nebennierenrinde ist fast ganz frei von mikroskopisch nachweisbaren Lipoiden; nur hier und da sieht man in einigen Zellen lipoide Substanzen und unter diesen sehr vereinzelte doppelbrechende Tropfen von Cholesterinestern.

Fall 21. J. B., 43jähriger Mann. Aufgenommen 9. II. 1918; gestorben 19. II. 1918. Sektion 20. II.

Klin. Diagnose: Nephritis acuta parenchymatosa + Bronchitis diffusa.

Digitized by Google

Pathol.-anat. Diagnose: Glomerulonephritis subacuta + Hypertrophia ventr. sin. cordis + Bronchitis chron. mucopurulenta + Bronchopneumonia lob. inf. pulm. dxt.

Mäßiges Ödem um die Fußgelenke herum. In der Bauchhöhle etwa $^1/_2$ Liter Asciteesflüssigkeit. — Doppelseitiger Hydrothorax. — Deutliche linksseitige Herzhypertrophie.

Die Leber ist mäßig vergrößert, fest. Sie zeigt im Schnitt eine recht homogene, rotbraune Schnittfläche mit undeutlicher Zeichnung. Das Parenchym ist klar, stark feucht.

Die Leber mikroskopisch ohne Besonderheiten.

Die Nieren sind beträchtlich vergrößert; sie wiegen zusammen 700 g. Ihre Konsistenz ist schlaff. Die Rinde ist deutlich breiter als normal, von gelbweißer Farbe und von einer opaken Beschaffenheit. Keine Blutungen sichtbar. Die Kapsel läßt sich mit gewöhnlicher Leichtigkeit ablösen, und die Nierenoberfläche darunter ist eben.

Die Nieren zeigen bei mikroskopischer Untersuchung große, recht zellenreiche Glomeruli. Außerdem findet man mehrorts eine bedeutende Zellenproliferation in der Bowmanschen Kapsel mit Ausbildung schöner „Halbmonde". Eine Hyalinisierung der Glomerulischlingen wird nicht angetroffen. In den gewundenen Kanälchen, die weit sind mit niedrigen Epithelien, findet man reichlich rote Blutkörperchen und Leukocyten. Nirgends hyaline tropfenförmige Umwandlung des Kanälchenepithels. In den Interstitien sieht man in ziemlich reichlicher Menge Rundzelleninfiltrat sowie eine mäßige Bindegewebsvermehrung. Die Nierenarterien, die größeren wie die kleineren, sind unverändert. In auf Fett gefärbten Präparaten sieht man reichlich Lipoide basal in den Epithelien der gewundenen Kanälchen, hauptsächlich blaugefärbt mit Nilblausulfat, darunter in reichlicher Menge Cholesterinester. Keine Fettsubstanzen in den Interstitien.

Die Nebennieren zeigen makroskopisch normales Aussehen. Mikroskopisch findet man Lipoide in reichlicher Menge diffus in den Schichten der Rinde verteilt. Unter den Lipoiden sehr reichlich Cholesterinester.

Fall 22. A. L., 32jähriger Mann. Aufgenommen 7. III. 1918; gestorben 18. III. 1918. Sektion 19. III.

Klin. Diagnose: Tuberculosis pulmonum et intestini + Degeneratio amyloid. organum.

Pathol.-anat. Diagnose: Tuberculosis chron. et recens pulm. amb. + Degeneratio amyloid. organum + Nephrosis.

Leber groß und fest. Parenchym graulich durchscheinend. — Die Nieren beträchtlich vergrößert und sehr schlaff. Die Rinde zeigt nicht die gewöhnliche Zeichnung, das Parenchym ist gelblich und hat einen speckigen Charakter. Die Nierenoberfläche ist eben. Die Nebennieren sind groß und erscheinen fester als normal; die Rinde hat die gewöhnliche Breite, das Mark aber ist deutlich breiter als normal.

Die Leber zeigt Amyloid in recht reichlicher Menge. Hier und da in den Leberzellen vereinzelte große Fetttropfen, die sich mit Nilblausulfat rot färben.

Digitized by Google

In den Nieren sind die Epithelien der gewundenen Kanälchen teils groß und geschwollen, eine schöne hyaline, tropfenförmige Umwandlung zeigend, teils niedrig um ein erweitertes Kanälchenlumen herum. Die geraden Kanälchen unverändert. Reichliche Mengen von Amyloid in den Glomeruli, die im übrigen keine Veränderungen aufweisen. Keine Bindegewebsvermehrung; keine Gefäßveränderungen. Die Epithelien der gewundenen Kanälchen reich an Lipoiden, die von Nilblausulfat dunkelblau oder blaurot gefärbt werden. Die Lipoide kommen am reichlichsten in den niedrigen Epithelien und nur spärlich in denen mit hyalinen Tropfen vor. Cholesterinester finden sich in sehr reichlicher Menge in den Epithelien der gewundenen Kanälchen, so daß im Polarisationsmikroskop die doppelbrechenden Substanzen als fast vollständig geschlossene ringförmige Bildungen erscheinen. Auch in den Kanälchenlumina kommen recht reichlich Cholesterinester vor.

Die Nebennieren zeigen reichliche Mengen von Amyloid im Mark. In der Rinde findet man ziemlich reichlich Lipoide, darunter Cholesterinester in mäßiger Menge.

Von diesen 22 Fällen können die fünf ersten am ehesten als normale Fälle bezeichnet werden. Die fraglichen Individuen sind ohne vorhergehende Krankheit gestorben, und der Tod ist mehr oder weniger direkt durch äußere traumatische Einwirkung verursacht worden. Sowohl die Sektionserscheinungen als auch der mikroskopische Befund in den Organen bei diesen Fällen lassen durchaus eine solche Bezeichnung zu. Die übrigen Fälle beziehen sich auf Individuen, die nach längerer Zeit dauernder Krankheit gestorben sind, und bei denen die krankhaften Veränderungen sich in den verschiedenen Organen des Körpers kundgetan haben.

Ich habe die normalen Fälle mit untersucht, um zu einer Auffassung von dem Auftreten und Vorkommen der Cholesterinester in normalen Organen zu gelangen und, gestützt hierauf, einen Vergleich mit dem Cholesterinesterbefund in den krankhaft veränderten Organen anstellen zu können. Es ist indessen ganz klar, daß eine Untersuchung von fünf normalen Fällen bei weitem nicht genügt, um ein deutliches Bild von den physiologischen Variationen in der einen oder anderen Hinsicht, die vorkommen können, zu geben, und vor allem wäre eine Untersuchung von Organen auch aus früheren Altersstufen erwünscht gewesen, doch sind ja, wie jedermann weiß, gerade die normalen Fälle am seltensten und am schwersten zugänglich.

Da die Organe nach Sektion der einzelnen Fälle erhalten wurden, welche frühestens 6 Stunden nach dem Tode und bisweilen erst nach 24 Stunden, ja, in Fall 4 erst nach 3 Tagen vorgenommen

Digitized by Google

worden ist, so kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß autolytische, postmortale Prozesse die Cholesterinester auf irgendeine Weise haben verändern können. Man hätte solchenfalls zunächst wohl an eine Spaltung der Cholesterinester zu denken. Doch habe ich nicht den Eindruck erhalten, daß eine solche vorkommt, obwohl ich eine derartige Möglichkeit nicht leugnen kann, da ich keine näheren Untersuchungen hierüber angestellt habe. Schulz[1]) und Cytronberg[2]) glauben den Nachweis geführt zu haben, daß eine Spaltung von Cholesterinestern durch Autolyse von Pferdeblut eintreten kann. Indessen lassen sich gegen die von ihnen angewandten Methoden so große Einwendungen erheben, daß ihre diesbezüglichen Äußerungen mit großer Vorsicht aufzunehmen sind.

In den von mir untersuchten oben angegebenen Fällen habe ich also, wie zu erwarten war, keine Cholesterinester morphologisch in normalen Lebern oder Nieren gefunden, wohl aber dagegen solche in der Rinde der normalen Nebennieren in reichlicher Menge, und zwar in sämtlichen Schichten der Rinde.

In den pathologischen Fällen wurden niemals Cholesterinester morphologisch in der Leber angetroffen, nicht einmal die Fälle 10 und 11, wo die Individuen an Lebercirrhose gelitten haben, machten eine Ausnahme von dieser Regel. Aschoff[3]) gibt an, daß er Lipoidanhäufungen in den Kupfferschen Sternzellen und darunter Cholesterinester bei Fällen von Lebercirrhose und bei chronischem Stauungsikterus gesehen habe. In keinem meiner beiden Fälle von Lebercirrhose habe ich Lipoide in den Kupfferschen Sternzellen und auch keine doppelbrechenden Substanzen finden können.

Was die Nieren betrifft, so findet man Cholesterinester morphologisch nur in den Fällen, wo es sich um ein Nierenleiden handelt, während die Fälle, wo das Individuum an einer anderen Krankheit gestorben ist, gleich den normalen Fällen vollkommen dieser Stoffe entbehren. Von den Nierenkrankheiten sind es nach Löhlein[4]), Stoerk[5]), Kawamura[6]) u. a., vor allem die chro-

[1]) Diese Zeitschr. **42**, 255. 1912.
[2]) Diese Zeitschr. **45**, 281. 1912.
[3]) Ber. d. Naturforsch.-Gesellsch. z. Freiburg **20**, 65. 1915.
[4]) Virchows Archiv **180**, 1. 1905.
[5]) Sitzungsberichte d. Kais. Akad. d. Wissensch. in Wien **115**, 31. 1906.
[6]) Die Cholesterinesterverfettung. Jena 1911.

Digitized by Google

nischen Nephropathien, die in dieser Hinsicht vom Normalen abweichen, während die akuten Fälle kein Vorkommen von Cholesterinestern morphologisch zeigen. Meine Untersuchungen bestätigen dies völlig. Die Fälle, bei denen das Vorkommen von Cholesterinestern am allerreichlichsten war, waren diejenigen, bei denen die Nierenveränderungen ausschließlich oder in höherem Grade auf die gewundenen Kanälchen beschränkt waren, also die reinen Nephrosen, Fälle 14 und 22, oder Glomerulonephritiden, wo auch die gewundenen Kanälchen kräftig in den Krankheitsprozeß einbezogen waren, z. B. die Fälle 17, 19 und 21. Waren indessen die degenerativen Veränderungen in den Kanälchen von kürzerer Dauer gewesen, wie in den Fällen 16 und 18, so wurden keine doppelbrechenden Substanzen angetroffen.

Die Nebennieren zeigen in den pathologischen Fällen einen stärker variierenden Gehalt an Cholesterinestern als die normalen. Die morphologisch wahrnehmbare Menge ist in ein paar Fällen außerordentlich gering, in anderen Fällen mäßig und in wieder anderen beträchtlich reichlich gewesen. Eine sehr geringe Menge doppelbrechender Substanz wurde in den Fällen 7, 9 und 20 angetroffen, insbesondere im letzteren fehlten Cholesterinester fast ganz. Einen Reichtum an Cholesterinestern in der Nebennierenrinde zeigt außer den normalen Fällen ein Teil der Fälle von Nierenkrankheiten, doch wechselt der Cholesteringehalt recht sehr innerhalb dieser Krankheitsgruppe.

Was das Vorkommen von Cholesterinestern in der Nebennierenrinde betrifft, so ist dasselbe in den Fällen, wo die Menge reichlich ist, gewöhnlich diffus in sämtlichen Schichten verteilt. Ist die Menge geringer, so treten diese Stoffe mehr herdweise und gewöhnlich in der Weise auf, daß man sie, wo sie vorkommen, in allen Schichten antrifft, und zwischen diesen Gebieten gehen Züge durch die ganze Rinde, die mehr oder weniger der Cholesterinester entbehren. Ist die Menge doppelbrechender Substanzen sehr gering, so findet man sie hier und da in vereinzelten Zellen oder Zellengruppen, gewöhnlich in der Zona fasciculata.

In beiden Nieren und Nebennieren findet man gleichzeitig mit Cholesterinestern auch andere Lipoide. In den Nieren treten ja diese anderen Lipoide auch ohne gleichzeitiges Vorkommen von Cholesterinestern auf, in den Nebennieren kommen aber diese und die anderen Lipoide stets zusammen vor, und es ist in Wirk-

Digitized by Google

lichkeit auffallend, wie konstant diese verschiedenen Stoffe einander begleiten; wenigstens zeigen die morphologischen Untersuchungen dies. Wo die Cholesterinester in geringer Menge vorkommen, sind auch die übrigen Lipoide sehr spärlich vertreten, und stets sind die beiden Arten von Stoffen in denselben Zellen oder Zellengruppen lokalisiert.

Quantitative chemische Bestimmungen an meinen Fällen.

Bevor ich die Ergebnisse meiner quantitativen chemischen Bestimmungen betreffs des Gehalts an freiem und als Ester gebundenem Cholesterin in Leber, Nieren und Nebennieren vorlege, will ich folgendes bezüglich der Behandlung des Untersuchungsmaterials erwähnen. Von den Nieren habe ich zur Untersuchung sowohl Rinde als Mark benutzt, doch so, daß ich es vermieden habe, die dem Nierenbecken zunächstliegenden Teile mitzunehmen, um nicht Fettgewebe mitzubekommen. Von den Nebennieren habe ich gleichfalls sowohl Rinde als Mark verwendet, nachdem das Organ sorgfältig von allem Fett an der Oberfläche gereinigt worden war. Anfangs führte ich Bestimmungen an der rechten wie auch an der linken Niere aus, da ich aber stets ungefähr dieselben Werte für beide Nieren erhielt, habe ich bei meinen späteren Bestimmungen nur die eine Niere untersucht, nachdem ich jedoch durch mikroskopische Untersuchung mich davon überzeugt hatte, daß kein Unterschied zwischen den beiden Nieren vorhanden war

Was die Nebennieren anbelangt, so sind gewöhnlich beide Organe zusammen zermahlen und dann von dieser Masse Material zu einer Bestimmung abgewogen worden In einigen Fällen habe ich jedoch Bestimmungen an den beiden Nebennieren desselben Falles je für sich vorgenommen.

Der Gehalt des freien und als Ester gebundenen Cholesterins in der Leber zeigt, wie aus der Tabelle hervorgeht, sehr geringe Variationen zwischen den verschiedenen Fällen, und die Variationen sind nicht größer zwischen den verschiedenen Fällen, wo die Individuen an einer Krankheit gelitten haben, als zwischen den einzelnen normalen Fällen. Auch in den Fällen, wo ich morphologisch recht beträchtliche Mengen Fett in den Leberzellen fand, ist keine augenfällige Zunahme des freien oder gebundenen Cholesterins zu verzeichnen. Dies gilt z. B. von dem einen Falle

Digitized by Google

Tabelle XIII.

Gehalt des freien und gebundenen Cholesterins in der Leber.

Fall Nr.	Art des Falles	Gehalt an Wasser %	Freies Cholesterin		Gebundenes Cholesterin		Totalgehalt	
			der feuchten Substanz %	der Trocken-substanz %	der feuchten Substanz %	der Trocken-substanz %	der feuchten Substanz %	der Trocken-substanz %
1	A. B., 46 Jahre, ♂: Normaler Fall.	75,1182	0,177	0,709	0,078	0,315	0,255	1,024
2	H. A., 20 Jahre, ♂: „ „	77,1813	0,259	1,133	0,065	0,287	0,324	1,420
3	A. J., 29 Jahre, ♂: „ „	74,1098	0,305	1,181	0,072	0,281	0,377	1,462
4	E. H., 30 Jahre, ♀: „ „	73,4351	0,208	0,784	0,046	0,173	0,254	0,957
5	J. E., 67 Jahre, ♂: „ „	74,4295	0,336	1,313	0,060	0,237	0,396	1,550
6	E. B., 59 Jahre, ♂: Diabetes.	72,7429	0,256	0,940	0,064	0,234	0,320	1,174
7	N. S., 42 Jahre, ♂: „	71,7094	0,212	0,750	0,029	0,103	0,241	0,853
8	A. F., 45 Jahre, ♀: Anaemia pern.	78,4558	0,351	1,629	0,046	0,213	0,397	1,842
9	J. N., 34 Jahre, ♀: „ „	71,5303	0,369	1,390	0,054	0,190	0,423	1,580
10	A. M., 40 Jahre, ♂: Lebercirrhose.	76,6912	0,254	1,093	0,023	0,099	0,277	1,192
11	K. J. A., 51 Jahre, ♂: „	80,2217	0,244	1,237	0,064	0,326	0,308	1,563
12	A. B., 37 Jahre, ♂: Nephrit. chron.	nicht bestimmt						
13	A. L., 34 Jahre, ♀: Nephritis subacuta.	77,2350	0,278	1,223	0,057	0,251	0,335	1,474
14	E. E., 38 Jahre, ♀: Hypernephroma / Nephrosis.	70,0442	0,318	1,064	0,076	0,254	0,394	1,318
15	A. L., 39 Jahre, ♀: Nephritis chron.	76,7553	0,234	1,007	0,039	0,169	0,273	1,176
16	E. S., 39 Jahre, ♀: Sepsis / Degen. parench. renum.	nicht bestimmt						
17	K. V., 33 Jahre, ♀: Glomerulonephritis.	77,8975	0,345	1,561	0,085	0,386	0,430	1,947
18	J. J., 5 Jahre, ♂: Diphtheria / Glom. nephritis ac.	76,5124	0,232	0,989	0,043	0,181	0,275	1,170
19	E. L., 32 Jahre, ♂: Nephritis chron.	77,9225	0,239	1,085	0,051	0,235	0,290	1,320
20	S. F., 20 Jahre, ♂: Sublimatvergiftung.	nicht bestimmt						
21	J. B., 43 Jahre, ♂: Glom. nephrit. subac.	77,2424	0,261	1,148	0,025	0,111	0,286	1,259
22	A. L., 32 Jahre, ♂: Tbc. pulmon. / Nephrosis.	80,2172	0,278	1,408	0,029	0,149	0,307	1,557

Digitized by Google

von Lebercirrhose, Fall 10, der übrigens den niedrigsten Wert von gebundenem Cholesterin in der ganzen Serie aufweist. Auch in dem anderen Falle von Lebercirrhose, Fall 11, ist dieser Wert nicht höher als normal. Dies spricht kaum für Aschoffs obenerwähnte Auffassung, wonach man bei Lebercirrhose eine Anhäufung von Cholesterinestern in den Kupfferschen Sternzellen in der Leber erhielte, doch ist es natürlich unmöglich, die Frage durch eine Untersuchung von nur zwei Fällen zu entscheiden.

Landau und Mc Nee[1]) haben, wie in der Einleitung erwähnt wurde, quantitative chemische Untersuchungen über den Gehalt der Leber an freiem und als Ester gebundenem Cholesterin angestellt, und da diese Untersuchungen meines Wissens die einzigen sind, die an menschlichen Lebern ausgeführt worden sind, so will ich zum Vergleich mit meinen Werten die von ihnen gefundenen anführen, zumal ihre Resultate beträchtlich von den meinigen abweichen.

Tabelle XIV.

Gehalt der Leber an freiem Cholesterin und Cholesterinestern nach Landau und Mc Nee.

Alter, Geschlecht	Anatomische Diagnose	Morphologischer Fettgehalt der Leber	Gehalt an freiem Cholesterin in %	Gehalt an Cholesterinestern in %	Gehalt an Gesamtcholesterin in %
52 Jahre, ♂	Lungenphthise	gering	0,02	0,16	0,18
37 Jahre, ♀	Placenta praevia, Cervixruptur	sehr gering	0,15	0,04	0,19
40 Jahre, ♂	Alcoholismus, Schluckpneumonie	gering	0,17	0,04	0,21
48 Jahre, ♂	Lebercirrhose	mäßig	0,16	0,05	0,21
?	Genuine Schrumpfniere, Herzhypertrophie	mäßig	0,04	0,17	0,21
37 Jahre, ♂	Carcinom des Caecum	sehr reichlich	nichts	0,25	0,25
21 Jahre, ♀	Lungenphthise	hochgradige Fettleber	0,34	nichts	0,34
64 Jahre, ♂	Biliäre Cirrhose	sehr reichlich	0,06	0,32	0,38
27 Jahre, ♂	Lungenphthise	hochgradige Fettleber	0,46	nichts	0,46

[1]) Zieglers Beiträge z. Path. u. pathol. Anat. 58, 667. 1914.

Digitized by Google

Betrachtet man die Zahlen in Landaus und Mc Nees oben angeführten Bestimmungen und vergleicht man sie mit meinen Werten, so bemerkt man sogleich die großen Variationen zwischen den Werten in den verschiedenen Fällen bei jenen Autoren. Was mich am meisten frappierte, war, daß Landau und Mc Nee in mehreren Fällen sehr niedrige Werte für das freie Cholesterin erhielten, und daß in einem Falle überhaupt kein freies Cholesterin vorhanden war; entsprechend diesen niedrigen Werten für das freie fanden sich hohe Werte für das gebundene. Die Werte waren eben solche, wie ich sie erhielt, wenn ich den Cholesteringehalt in Organen bestimmte, die vor der Extraktion getrocknet worden waren, in welchen Fällen, wie ich in meinen methodologischen Untersuchungen gezeigt habe, eine Verschiebung der Werte für das freie und das gebundene Cholesterin zugunsten des letzteren eintrat. Etwas Ähnliches ist sicherlich Landau und Mc Nee passiert, und dies um so wahrscheinlicher, als sie bei ihren chemischen Untersuchungen feinverteilte Lebermasse mit Gips verrührten und dann die Mischung 24 Stunden lang bei etwa 40° trockneten. Was die Fälle betrifft, wo die Werte für das gebundene Cholesterin niedrig sind, so können sie möglicherweise richtig sein, indessen erscheint es wunderlich, daß sie in zwei Fällen überhaupt keine Cholesterinester erhielten, und man hat auch diese Fälle mit großer Vorsicht aufzunehmen. Ob die Werte für den Gesamtgehalt des gebundenen und freien Cholesterins richtig sind, will ich dahingestellt sein lassen. Als Gesamturteil ist zu sagen, daß die Untersuchung Landaus und Mc Nees über den Cholesteringehalt der Leber wertlos ist.

Es wäre auch recht wunderlich, wenn die Leber, die nach der übereinstimmenden Ansicht aller Forscher eine aktive Rolle bei dem Cholesterinumsatz des Organismus spielt, und die das Vermögen besitzt, durch die Galle Cholesterin auszuscheiden, einen so variierenden Gehalt an freiem und gebundenem Cholesterin haben sollte, wie man das den Landau- und -Mc Neeschen Werten nach zu erwarten hätte. Im Gegenteil sollte man auf Grund ihrer Funktion erwarten können, daß die Werte sowohl des freien wie auch des als Ester gebundenen Cholesterins recht wenig wechselten. Meine Werte zeigen denn auch recht unbedeutende Variationen zwischen den verschiedenen Fällen und stehen demnach mit den oben angeführten Verhältnissen in gutem Einklang.

Digitized by Google

Fall Nr.	Art des Falles		Gehalt an Wasser %	Freies Cholesterin		Gebund. Cholesterin		Totalgehalt	
				der feuchten Substanz %	der Trocken-substanz %	der feuchten Substanz %	der Trocken-substanz %	der feuchten Substanz %	der Trocken-substanz %
1	A. B, 46 Jahre, ♂: Normaler Fall.	Rechte Niere	79,1788	0,340	1,633	0,031	0,152	0,371	1,785
	A. B., 46 Jahre, ♂: „ „	Linke „	79,096	0,342	1,639	0,031	0,149	0,373	1,788
2	H. A., 20 Jahre, ♂: „ „	Rechte „	79,6061	0,283	1,389	0,022	0,107	0,305	1,496
	H. A., 20 Jahre, ♂: „ „	Linke „	79,3518	0,290	1,450	0,020	0,100	0,310	1,550
3	A. J., 29 Jahre, ♂: „ „	Rechte „	79,2245	0,327	1,573	0,016	0,079	0,343	1,652
	A. J., 29 Jahre, ♂: „ „	Linke „	79,6018	0,302	1,483	0,018	0,089	0,320	1,572
4	E. H., 80 Jahre, ♀: „ „	Rechte „	80,7258	0,266	1,383	0,027	0,142	0,293	1,525
	E. H., 80 Jahre, ♀: „ „	Linke „	80,7001	0,268	1,390	0,021	0,110	0,289	1,500
5	J. E., 67 Jahre, ♂: „ „	Rechte „	81,9822	0,338	1,877	0,011	0,061	0,349	1,938
	J. E., 67 Jahre, ♂: „ „	Linke „	81,9426	0,345	1,911	0,017	0,097	0,362	2,008
6	E. B., 59 Jahre, ♂: Diabetes.	Eine „	77,4899	0,342	1,519	0,028	0,124	0,370	1,643
7	N. S., 42 Jahre, ♂: „	Eine „	76,8992	0,303	1,315	0,019	0,083	0,322	1,398
8	A. F., 45 Jahre, ♀: Anaemia perniciosa.	Rechte „	82,0625	0,257	1,438	0,025	0,141	0,282	1,579
	A. F., 45 Jahre, ♀: „ „	Linke „	81,8350	0,272	1,501	0,033	0,188	0,305	1,684
9	J. N., 84 Jahre, ♀: „ „	Eine „	83,9651	0,266	1,655	0,019	0,122	0,205	1,777
10	A. M, 40 Jahre, ♂: Lebercirrhose.	Rechte „	80,1501	0,311	1,567	0,029	0,149	0,340	1,716
	A. M., 40 Jahre, ♂: „	Linke „	80,3433	0,312	1,585	0,029	0,146	0,341	1,731
11	K. J. A., 51 Jahre, ♂: „	Eine „	85,0818	0,245	1,640	0,033	0,221	0,278	1,861
12	A. B., 37 Jahre, ♂: Herzhypertrophie, Arteriosklerose / Nephritis chron.	Eine „	84,2408	0,238	1,508	0,103	0,655	0,341	2,163
13	A. L., 34 Jahre, ♀: Herzhypertrophie / Nephritis subacuta.	Eine „	86,1316	0,243	1,754	0,102	0,737	0,345	2,491
14	E. E., 38 Jahre, ♀: Hypernephroma malign. / Nephrosis, Amyloiddeg.	Rechte „	80,4556	0,356	1,822	0,188	0,968	0,544	2,790
	E. E., 38 Jahre, ♀: „	Linke „	80,9776	0,349	1,837	0,187	0,984	0,536	2,821
15	A. L., 39 Jahre, ♀: Nephritis chron.	Rechte „	85,1913	0,205	1,389	0,068	9,460	0,273	1,849
	A. L., 39 Jahre, ♀: „ „	Linke „	85,2006	0,203	1,372	0,064	0,439	0,267	1,811
16	E. S., 39 Jahre, ♀: Sepsis / Degeneratio parench. renum.	Eine „	82,8764	0,321	1,878	0,018	0,104	0,339	1,977
17	K. V., 38 Jahre, ♀: Herzhypertrophie, Arteriosklerose / Glomerulonephritis.	Eine „	84,4575	0,297	1,916	0,294	1,894	0,591	3,810
18	J. J., 5 Jahre, ♂: Diphtheria / Glomerulonephritis acuta.	Eine „	82,6745	0,296	1,708	0,087	0,215	0,383	1,923
19	E. L, 32 Jahre, ♂: Herzhypertrophie / Nephritis chronica.	Eine „	83,7954	0,273	1,684	0,168	1,039	0,441	2,723
20	S. F., 20 Jahre, ♂: Sublimatvergiftung.	Eine „	80,8618	0,382	1,994	0,048	0,254	0,430	2,248
21	J. B., 43 Jahre, ♂: Herzhypertrophie / Glomerulonephritis subacuta.	Eine „	85,4194	0,298	2,011	0,202	1,387	0,495	3,398
21	A. L., 32 Jahre, ♂: Tuberculosis pulmonum / Nephrosis, Amyloiddegen.	Eine „	83,6110	0,345	2,108	0,419	2,557	0,764	4,665

Digitized by Google

Es ist möglich, daß eine größere Untersuchungsserie, als die meinige, größere Variationen darbieten könnte, doch glaube ich es kaum. Man kann doch nicht erwarten, daß die Leberzellen, wenn sie auch eine große Neigung haben, Neutralfett und andere Lipoide aufzunehmen und anzuhäufen, eine Anhäufung von Cholesterin und Cholesterinestern zeigen werden, und in den Fällen, wo Aschoff morphologisch Cholesterinester in der Leber gefunden hat, ist es nicht in den Leberzellen selbst, sondern in den Kupfferschen Sternzellen und in den Bindegewebszellen in der Capsula Glissoni gewesen.

Betrachtet man die Werte für das freie und das als Ester gebundene Cholesterin in den Nieren, so findet man betreffs des ersteren sehr wenig variierende Werte, und innerhalb der verschiedenen Krankheitsgruppen sind die Variationen nicht größer als bei normalen Individuen. Die Werte für das gebundene Cholesterin sind gleichfalls sowohl bei normalen Fällen als in den Fällen, wo die Individuen an Diabetes, perniziöser Anämie, Lebercirrhose oder Sepsis gestorben sind wenig variierend und überall sehr niedrig. Dagegen findet man bei den Nierenkrankheiten Werte für das gebundene Cholesterin, die beträchtlich höher sind als normal. Meine Untersuchungen liefern eine sehr gute Bestätigung für die von Aschoff[1]) ausgesprochene Ansicht, daß von Cholesterin und Cholesterinestern in den Nieren das Cholesterin die feste und stabile Komponente, die Ester dagegen die labile darstellen, die erst, wenn die Zellen auf die eine oder andere Weise geschädigt werden, so daß der celluläre Stoffwechsel eine Störung erfährt, in vermehrter Menge, wahrscheinlich aus dem Blute aufgenommen und angehäuft, auftritt, nachdem die Krankheit einige Zeit gedauert hat, am stärksten bei den chronischen degenerativen Veränderungen der gewundenen Kanälchen ausgesprochen ist, also bei Nephrosen, Fälle 14 und 22, sowie bei den Nephritiden, wo auch die Kanälchen krankhaft verändert sind, Fälle 17, 19 und 21.

Die Werte, die ich bei meinen quantitativen chemischen Bestimmungen an den Nieren erhalten habe, stimmen sehr gut mit den von Windaus zuvor bei einer ähnlichen Untersuchung erhaltenen überein, wie sie oben auf S. 87 wiedergegeben sind.

[1]) Zieglers Beiträge z. allg. Path. u. pathol. Anat. 47, 1. 1910.

Digitized by Google

Tabelle XVI. Gehalt des freien und gebundenen Cholesterins in den Nebennieren.

Fall Nr.	Art des Falles		Gehalt an Wasser %	Freies Cholesterin		Gebund. Cholesterin		Totalgehalt	
				der feuchten Substanz %	der Trocken-substanz %	der feuchten Substanz %	der Trocken-substanz %	der feuchten Substanz %	der Trocken-substanz %
1	A. B., 46 Jahre, ♂: Normaler Fall.					nicht bestimmt			
2	H. A., 20 Jahre, ♂: „ „	Rechte Nebenniere	66,6400	0,889	2,665	5,775	17,318	6,664	19,978
	H. A., 20 Jahre, ♂: „ „	Linke „	66,6085	0,874	2,617	5,794	17,353	6,665	19,970
3	A. J., 29 Jahre, ♂: „ „	Rechte „	75,7674	0,678	2,797	1,917	9,918	2 595	10,710
	A. J., 29 Jahre, ♂: „ „	Linke „	75,7830	0,686	2,836	1,919	7,928	2,605	10,762
4	E. H., 30 Jahre, ♀: „ „	Eine „	69,4828	0,428	1,402	4,575	14,990	5,006	16,396
5	J. E., 67 Jahre, ♂: „ „	Rechte „	72,7789	0,817	3,000	4,030	14,808	4,847	17,808
	J. E., 67 Jahre, ♂: „ „	Linke „	72,7588	0,807	2,962	4,011	14,725	4,818	17,687
6	E. B., 59 Jahre, ♂: Diabetes.					nicht bestimmt			
7	N. S., 42 Jahre, ♂: „	Eine „	71,2756	0,687	2,898	0,848	2,954	1,535	5,847
8	A. F., 45 Jahre, ♀: Anaemia perniciosa.					nicht bestimmt			
9	J. N., 34 Jahre, ♀: „ „					„ „			
10	A. M., 40 Jahre, ♂: Lebercirrhose.	Eine „	75,2705	0,484	1,756	1,853	5,471	1,787	7,227
11	K. J. A., 51 Jahre, ♂: „	Eine „	77,5171	0,481	2,141	1,753	7,800	2,234	9,941
12	A. B., 37 Jahre, ♂: Herzhypertrophie, Arteriosklerose Nephritis chron.	Eine „	72,9094	0,998	3,668	3,960	14,618	4,953	18,285
13	A. L., 34 Jahre, ♀: Nephritis subacuta.					nicht bestimmt			
14	E. E., 38 Jahre, ♀: Hypernephroma malignum Nephrosis, Amyloiddegen.	Eine „	68,0865	1,268	3,955	5;806	18,193	7,074	22,148
15	A. L., 39 Jahre, ♀: Nephritis chron.	Rechte „	72,2498	0,616	2,222	5,618	20,246	6,234	22,468
	A. L., 39 Jahre, ♀: „ „	Linke „	72,2552	0,609	2,196	5,602	20,192	6,211	22,388
16	E. S., 39 Jahre, ♀: Sepsis Degen. parench. renum.					nicht bestimmt			
17	K. V., 38 Jahre, ♀: Herzhypertrophie, Arteriosklerose Glomerulonephritis.	Eine „	78,6852	0,619	2,897	2,500	11,704	3,119	14,601
18	J. J., 5 Jahre, ♂: Diphtheria Glomerulonephritis acuta.	Eine „	74,3492	0,667	2,600	1,681	6,544	2,348	9,154
19	E. L., 32 Jahre, ♂: Herzhypertrophie Nephritis chron.	Eine „	78,5899	0,578	2,697	2,158	10,056	2,736	12,753
20	S. F., 20 Jahre, ♂: Sublimatvergiftung.	Eine „	77,8787	0,254	1,150	0,101	0,469	0,358	1,619
21	J. B., 43 Jahre, ♂: Herzhypertrophie Glomerulonephritis subacuta.	Eine „	73,5632	0,481	1,821	2,246	8,498	2,727	10,319
22	A. L., 32 Jahre, ♂: Tuberculosis pulmon. Nephrosis, Amyloiddegen.	Eine „	80,5490	0,412	2,120	1,033	5,313	1,445	7,433

Digitized by Google

Lapworth[1]) hat zwei Untersuchungen zu demselben Zwecke ausgeführt, die eine an einer Niere nach subakuter parenchymatöser Nephritis, die andere an einer chronischen parenchymatösen Nephritis. Im ersteren Falle fand er 0,33% gebundenes und 0,25% freies Cholesterin, im letzteren 0,32% bzw. 0,18%. Diese Lapworthschen Werte widersprechen in keiner Weise meinen Befunden.

Der Gehalt der Nebennieren an freiem Cholesterin weist innerhalb der ganzen Untersuchungsserie ziemlich unbedeutende Variationen zwischen den verschiedenen Fällen auf, während dagegen das als Ester gebundene Cholesterin höchst beträchtlich in den verschiedenen Fällen variiert; doch kann man wohl sagen, daß einem hohen Cholesterinestergehalt ein, wenn auch nicht völlig so deutlich, hoher Gehalt an freiem Cholesterin entspricht. Was die Cholesterinester betrifft, so sind die Werte für dieselben hoch teils in drei von meinen normalen Fällen, teils in einem Teil der Fälle mit Nierenkrankheiten. So zeigen die Fälle 14 und 15 die allerhöchsten Werte für Cholesterinester in der ganzen Serie. Sehr niedrige Werte, vor allem betreffs der Ester, zeigen die Fälle 7 und 20, besonders der letztgenannte.

Was die hohen Werte für gebundenes Cholesterin bei ein paar der Fälle mit Nierenkrankheiten anlangt, so ist es schwer zu entscheiden, ob die Werte hier so hoch sind, daß sie als einer wirklichen Erhöhung des Cholesteringehalts entsprechend angesehen werden können, denn in einem von den normalen Fällen findet sich ein fast ebenso hoher Wert, und es ist nicht unwahrscheinlich, daß man in einer größeren Serie normaler Fälle ebenso hohe Werte wie in den beiden genannten Fällen von Nierenkrankheiten erhalten könnte. Dagegen dürfte man aller Wahrscheinlichkeit nach annehmen können, daß die Werte in Fall 20 und möglicherweise in Fall 7 eine absolute Herabsetzung bezeichnen, die unter den physiologischen Variationen liegt. Für eine solche Annahme spricht auch der morphologische Befund bei Fall 20, der fast keine doppelbrechenden Lipoide zeigte, und bei dem übrigens auch die anderen Lipoide, die in der Nebennierenrinde vorkommen, so gut wie fehlten.

Wie oben in der Einleitung erwähnt, hat man verschiedentlich den Nebennieren eine wichtige Rolle bei dem Cholesterin-

[1]) Journ. of Pathology and Bacteriologie **15**, 254. 1911.

Digitized by Google

umsatz des Körpers beilegen wollen, und allerseits ist man darüber einig, daß die Nebennierenrinde Cholesterinester leicht aufnimmt und anhäuft. Landau und mit ihm die meisten deutschen Forscher auf diesem Gebiete sind der Ansicht, daß der Cholesterinestergehalt der Nebennieren den Cholesterinestergehalt des Organismus im übrigen und insbesondere den Gehalt des Blutes an diesen Stoffen wohl abspiegelt. Zu dieser Auffassung sind verschiedene Autoren vor allem durch das Studium der experimentellen Cholesterinsteatose bei Kaninchen gekommen. Ausgehend von diesen experimentellen Erfahrungen hat man auch versucht, die menschliche Arteriosklerose in denselben biologischen Rahmen einzufügen, und man hat einen vermehrten Cholesteringehalt im Blute als einen wichtigen Faktor für die Entstehung dieser Krankheit betrachten wollen. Ganz natürlich hat man daher die menschlichen Nebennieren auf ihren Gehalt an gebundenem und freiem Cholesterin hin untersucht. So haben Wacker und Hueck[1]) den Gehalt der Nebennieren an diesen Stoffen in 7 Fällen bestimmt, und Landau und Mc Nee[2]) haben eine Untersuchungsserie von 20 Fällen vorgelegt. Wacker und Hueck glauben auf Grund ihrer Zahlen zeigen zu können, daß der Cholesterinestergehalt sehr reichlich ist bei Atherosklerose, chronischen Nierenleiden, Diabetes und Schwangerschaft, dagegen stark herabgesetzt bei allen länger dauernden septischen und infektiösen Prozessen. Landau und Mc Nee kamen zu ähnlichen Resultaten und betonen, daß der Cholesterinestergehalt bei Schrumpfniere, Atherosklerose und Cardiopathien „sehr beträchtlich gesteigert", bei Phthise und anderen Infektionskrankheiten herabgesetzt ist.

Prüft man jedoch die Zahlen dieser Autoren, so findet man, daß Wacker und Hueck den höchsten Wert für die Cholesterinester bei einem 67jährigen Mann erhalten haben, der an Apoplexie gestorben war, und der eine allgemeine Arteriosklerose gehabt hatte. Sie fanden in diesem Falle 0,0493 g freies und 0,625 g gebundenes Cholesterin in den beiden Nebennieren, die zusammen 14,1 g wogen. Es ergibt dies, umgerechnet in Prozente des Gewichts der Nebennieren, 0,349% und 4,432% gebundenes Cholesterin, Werte also, die sich bei Vergleich mit den bei meinen

[1]) Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **71**, 373. 1913.

[2]) Zieglers Beiträge z. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **58**, 667. 1914.

Digitized by Google

Untersuchungen erhaltenen als deutlich innerhalb der physiologischen Variationsgrenzen liegend erweisen.

Landau und Mc Nees Untersuchung zeigt durchgehends sehr niedrige Werte, wenigstens im Vergleich mit meinen Bestimmungen, und ich bezweifle stark, daß ihre Resultate zuverlässig sind, da sie dasselbe Extraktionsverfahren wie bei ihren Untersuchungen über den Cholesteringehalt der Leber angewandt haben. Der höchste Wert, den Landau und Mc Nee in einem ihrer Fälle erhalten, ist 0,70% für freies und 3,01% für gebundenes Cholesterin.

Chauffard, Guy Laroch und Grigaut[1]), die früher als die ebengenannten Autoren den Cholesteringehalt menschlicher Nebennieren untersucht haben, fanden in drei Fällen mit Hypertension Werte für den Gesamtcholesteringehalt, die zwischen 7,745 und 4,032% des Gewichts der Organe schwankten, doch kann auch hier nicht der höchste Wert mit Sicherheit als eine wirkliche Überschreitung der physiologischen Variationsgrenze bezeichnet werden.

Ich glaube, daß man bis auf weiteres ein reichliches oder sogar sehr reichliches Vorkommen von Cholesterin und Cholesterinestern in der Nebennierenrinde mit großer Vorsicht zu beurteilen hat, und man muß sich hüten, einen reichlichen Gehalt an diesen Stoffen als etwas Pathologisches zu bezeichnen, da bereits normalerweise ein derartiger augenfälliger Reichtum an diesen Stoffen bestehen kann. Dagegen erachte ich es für mehr wahrscheinlich, daß eine pathologische Herabsetzung des Gehalts vorkommen kann, wenigstens zeigt besonders der Fall mit Sublimatvergiftung Verhältnisse, die dafür sprechen.

Der Auffassung, daß Krankheiten, die von einer Steigerung des Blutdrucks begleitet sind, einen höheren Cholesteringehalt in der Nebennierenrinde verursachen als andere, kann ich im Hinblick auf die Werte, die ich gefunden habe, nicht beitreten. In denjenigen Fällen, wo ich bei Nierenkrankheiten die höchsten Werte erhalten habe, also in den Fällen 14 und 15, hat eine linksseitige Herzhypertrophie gefehlt, das wichtigste Zeichen dafür, daß eine Blutdrucksteigerung während des Lebens vorgekommen

[1]) Compt. rend. de la soc. de biol. 6. VII. S. 23. 1912.

Digitized by Google

wäre; auch sind keine ausgesprochenen arteriosklerotischen Veränderungen im Gefäßsystem zu konstatieren gewesen.

Es ist meines Erachtens wahrscheinlicher, daß die Nebennieren, deren Rinde normalerweise das Vermögen besitzt, Cholesterinester aufzunehmen, diese sozusagen maximal auch unter normalen Verhältnissen aufnehmen können, und wohl wahrscheinlich ohne daß gleichzeitig ein abnorm hoher Gehalt an diesen Stoffen im Blute vorkommt. Der von Landau und anderen Autoren ausgesprochenen Ansicht, daß die Nebennierenrinde den Cholesteringehalt des Körpers im übrigen und zunächst den des Blutes widerspiegle, kann ich mich nicht anschließen, wenigstens nicht für alle Fälle. Sicherlich wird wohl niemand glauben, daß man bei einem Gehalt von 1% Cholesterin, wie es Stepp[1]) in einem Falle zeigt, der ungefähr das 5—6fache des normalen darstellt, eine entsprechende Vermehrung der Cholesterinester in den Nebennieren hätte. Andererseits möchte ich es für wahrscheinlich halten, daß eine Verminderung des Cholesteringehalts im Blute von einer entsprechenden Verminderung in der Rinde der Nebennieren begleitet sein kann.

Diese Verhältnisse sind indessen, wenigstens beim Menschen, noch so wenig erforscht, daß man am besten daran tut, sich mehr oder weniger hypothetischer Behauptungen zu enthalten. Überhaupt hat man anläßlich der Befunde bei der experimentellen Cholesterinsteatose allzu weitgehende Parallelen mit dem menschlichen Cholesterinumsatz gezogen und allzusehr dem Wunsche nachgegeben, was man in dieser Beziehung beim Menschen gefunden, möchte mit dem, was die Tierexperimente gezeigt haben, in Einklang stehen.

Vergleich zwischen den morphologischen und quantitativen chemischen Befunden.

Nachdem ich über meine chemischen Untersuchungen berichtet habe, wende ich mich zu den morphologischen Befunden zurück und will hier die Frage zu beantworten versuchen, ob es möglich ist, durch morphologische Untersuchung eine quantitative Auffassung von dem Cholesterinestergehalt der untersuchten Organe zu erhalten.

---

[1]) Münch. med. Wochenschr. 29, 781. 1918.

Digitized by Google

Um den Cholesterinestergehalt in einem Schnittpräparat zu schätzen, habe ich mich, wie oben betont wurde, nicht einer sicheren Methode bedient, sondern mich nur nach dem allgemeinen Eindruck des Cholesterinestergehalts gerichtet. Die Schnitte, die untersucht werden sollten, wurden nach ihren Nummern hervorgenommen und dann nach dem Cholesterinestergehalt in einer Reihe geordnet. Hierbei ließ es sich natürlich nicht vermeiden, daß die Präparate recht verschiedenen Alters waren, und nach Karwicka[1]) verlieren die Cholesterinester in Schnittpräparaten nach längerer oder kürzerer Zeit ihre charakteristischen Eigenschaften. Ich habe indessen nicht finden können, daß diese Behauptung Karwickas zutrifft, denn in von formalingehärteten Nebennieren herrührenden, in Glyzerin eingelegten Schnittpräparaten habe ich noch nach 4 Jahren eine reichliche Menge Cholesterinester mit charakteristischen Eigenschaften und dem Anschein nach in unverminderter Menge gefunden.

In nachstehender Tabelle sind die Nieren im Verhältnis zu ihrem morphologischen Gehalt an Cholesterinestern geordnet. Zum Vergleich sind auch die Werte angegeben, die in denselben Fällen bei den chemischen Untersuchungen erhalten worden sind.

Tabelle XVII.

Cholesterinestergehalt der Nieren.

Fall Nr.	Art des Falles	Morphologischer Befund	Gehalt an Cholesterinestern in %
22	A. L., 32 Jahre, ♂: Tuberculosis pulmon., Nephrosis, Amyloiddeg.	überaus reichlich	0,419
17	K. V., 33 Jahre, ♀: Glomerulonephritis, Herzhypertrophie	sehr reichlich	0,294
21	J. B., 43 Jahre, ♂: Glomerulonephritis subacuta, Herzhypertrophie	reichlich	0,202
14	E. E., 38 Jahre, ♀: Nephrosis, Amyloiddeg., Hypernephrome	mäßig	0,188
19	E. L., 32 Jahre, ♂: Nephritis chron., Herzhypertrophie	mäßig	0,168
13	A. L., 34 Jahre, ♀: Nephritis subacuta, Herzhypertrophie	gering	0,102
12	A. B., 37 Jahre, ♂: Nephritis chron., Herzhypertrophie	gering	0,103
15	A. L., 39 Jahre, ♀: Nephritis chron.	sehr gering	0,068

[1]) Zieglers Beiträge z. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **50**, 437. 1911.

Digitized by Google

Die Tabelle zeigt, wie man sieht, eine gute Übereinstimmung zwischen dem morphologischen und dem chemischen Befunde. Die Schnittpräparate waren sehr leicht nach dem Cholesterinestergehalt zu ordnen.

Man kann demnach mit Sicherheit sagen, daß einem morphologisch reichlichen Gehalt von Cholesterinestern in der Niere auch eine wirkliche Zunahme dieser Stoffe entspricht.

Ganz anders verhält es sich mit den Nebennieren, die auf dieselbe Weise untersucht worden sind. Das Resultat der Untersuchung ist aus der nachstehenden Tabelle ersichtlich.

Tabelle XVIII.

Cholesterinestergehalt der Nebennieren.

Fall Nr.	Art des Falles	Morphologischer Befund	Gehalt an Cholesterinestern in %
12	A. B., 37 Jahre, ♂: Nephritis chron., Herzhypertrophie	überaus reichlich	3,960
13	A. L., 34 Jahre, ♀: Nephritis subacuta	„	nicht bestimmt
8	A. F., 45 Jahre, ♀: Anaemia perniciosa	„	„
2	H. A., 20 Jahre, ♂: Normaler Fall	„	5,775
4	E. H., 30 Jahre. ♀: Normaler Fall	„	4,575
17	K. V., 33 Jahre, ♀: Glomerulonephritis, Herzhypertrophie	„	2,500
21	J. B., 43 Jahre, ♂: Glomerulonephritis subacuta, Herzhypertrophie	sehr reichlich	2,246
3	A. J., 29 Jahre, ♂: Normaler Fall	„	1,917
1	A. B., 46 Jahre, ♂: Normaler Fall	„	nicht bestimmt
5	J. E., 67 Jahre, ♂: Normaler Fall	„	4,030
15	A. L., 39 Jahre, ♀: Nephritis chronica	„	5,618
14	E. E., 38 Jahre, ♀: Nephrosis, Amyloiddeg.. Hypernephroma	reichlich	5,806
22	A. L., 32 Jahre, ♂: Tuberculosis pulmon., Nephrosis	„	1,033
19	E. L., 32 Jahre, ♂: Nephritis chron., Herzhypertrophie	mäßig	2,158
18	J. J., 5 Jahre, ♂: Diphtheria, Glomerulonephritis acuta	„	1,681
10	A. M., 40 Jahre, ♂: Lebercirrhose	„	1,353
11	K. J. A., 51 Jahre, ♂: Lebercirrhose	„	1,753
9	J. N., 34 Jahre, ♀: Anaemia perniciosa	sehr gering	nicht bestimmt
7	N. S., 42 Jahre, ♂: Diabetes	„	0,848
20	S. F., 20 Jahre, ♂: Sublimatvergiftung	beinahe nichts	0,104

Bei den Nebennieren war es oft schwer, die Präparate nach verschiedenem Cholesterinestergehalt zu ordnen, vor allem in den Fällen, wo reichlichere Mengen von diesen Stoffen vorhanden

Digitized by Google

waren. In der obigen Tabelle findet man in einer großen Anzahl Fälle einen augenfälligen Unterschied zwischen dem morphologischen und dem chemischen Befunde. Um ein Beispiel zu nehmen, so zeigte ein Vergleich zwischen den Schnitten von Fall 12 und 14 offensichtlich ein reichlicheres Vorkommen von Cholesterinestern in dem Schnitte von Fall 12, obwohl diese Nebenniere in Wirklichkeit weniger Cholesterinester als die andere enthielt. Zwar ist das hier geübte Verfahren, den Gehalt von Cholesterinestern in Schnitten zu schätzen, unsicher, da man aber deutlich einen Unterschied zwischen dem Vorkommen dieser Stoffe in den verschiedenen Schnitten findet, so können nicht die Mängel des Verfahrens das unbefriedigende Resultat erklären, zumal ich bei den Nieren ein gutes Resultat meiner vergleichenden Untersuchung erhielt. Da ferner stets größere Stücke zur mikroskopischen Untersuchung genommen und gehärtet worden sind, so kann auch nicht vermutet werden, daß ein wirklicher Unterschied zwischen den Teilen der Nebennieren vorhanden gewesen ist, die morphologisch und die chemisch untersucht worden sind. Auch glaube ich nicht, daß bei der Fixierung und sonstigen Behandlung des Präparats Veränderungen haben entstehen können. Die einzig mögliche Erklärung für die hier erwähnten Verhältnisse ist, soviel ich sehen kann, die, daß die Cholesterinester irgendwie an andere Stoffe in der Nebennierenrinde gebunden sein müssen, so daß sie nicht morphologisch wahrzunehmen sind.

Wacker und Hueck, die in ihrer oben erwähnten Arbeit die Nebennieren in ihren Fällen auch morphologisch untersuchten, sind der Ansicht, daß die morphologischen Befunde den chemischen gut entsprechen. Indessen haben Wacker und Hueck nur 7 Fälle, und die Fälle weisen bedeutende Variationen untereinander betreffs des Gehalts an Cholesterinestern auf; von diesen Fällen haben 3 Werte für gebundenes Cholesterin, die zwischen 0,055 und 0,326% schwanken. Ihre Resultate brauchen daher meinem Befunde nicht zu widersprechen.

Landau und Mc Nee meinen gleichfalls, daß die morphologischen und die chemischen Untersuchungen einander entsprechende Resultate ergeben. Sie bezeichnen den morphologischen Gehalt als „überaus reichlich" bei einem chemischen Gehalt von 1,50%—3,01% gebundenem Cholesterin, als „sehr

Digitized by Google

reichlich" bei einem Gehalt von 0,74%—1,03%, als „reichlich" bei einem Gehalt von 0,68% und 0,76%, aber auch bei einem Gehalt von 0,97%. Demnach dürften auch Landau und Mc Nee wenigstens keine vollkommene Übereinstimmung zwischen den morphologischen und den chemischen Befunden erhalten haben. Sie geben ferner an, daß, wenn die Cholesterinester einen gewissen Gehalt erreicht haben, die Möglichkeit, morphologisch ihren Gehalt zu schätzen, immer sich schwieriger gestaltet.

Thaysen[1]) fand bei Untersuchung von Ochsennebennieren, daß keine Möglichkeit bestand, einen bei chemischer Untersuchung gefundenen höheren Gehalt von Cholesterinestern dort morphologisch wahrzunehmen. Doch besagt Thaysens Untersuchung recht wenig, denn teils war der Cholesterinestergehalt in der Nebenniere, in der er den höchsten Wert erhielt, 1,40%, berechnet auf die Trockensubstanz im Organ, niedrig, teils fand er bei demselben Fall einen niedrigeren Wert für das freie Cholesterin als in irgendeinem anderen seiner Fälle, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, daß der Cholesterinesterwert zu groß und die Bestimmung unrichtig ist.

Indessen möchte ich betonen, daß unsere Möglichkeiten, morphologisch mit Sicherheit den Gehalt von Cholesterinestern in den Nebennieren zu bestimmen, sehr gering sind, und daß nur die quantitative chemische Untersuchung hier den endgültigen Ausschlag geben kann. Dagegen scheint es mir betreffs der Nieren, wenigstens meiner Untersuchung nach zu urteilen, durchaus möglich, den quantitativen Gehalt des Organs an Cholesterinestern durch eine Untersuchung von Schnittpräparaten annähernd zu schätzen. Doch bedarf es natürlich einiger Übung bei der Beurteilung, und wenn möglich, sind Schnitte von Nieren mit bekanntem Cholesterinestergehalt als Vergleichsmaterial heranzuziehen.

Zusammenfassung.

1. Die Windaussche Digitoninmethode, nach Thaysens Vorschriften ausgeführt, ist die einzige Methode, die bei reinen Cholesterinlösungen zuverlässige Werte gibt.

2. Zur Vorbehandlung der Organe, um das Cholesterin und die Cholesterinester zu extrahieren, ist eine Trocknung der Or-

[1]) Centralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. **26**, 433. 1915.

Digitized by Google

gane im Luftstrom verwerflich. Dagegen gibt eine Vorbehandlung mit 2proz. Natronlauge und nachfolgende Ätherextraktion der alkalischen Lösung, sowohl eine quantitative Extraktion als ein so reines Extrakt, daß das Cholesterin und die Cholesterinester sich mit der Windausschen Methode exakt bestimmen lassen.

3. Der Gehalt des freien und gebundenen Cholesterins in der Leber zeigt sehr geringe Variationen in meinen gesamten Fällen, zwei Fälle von Lebercirrhose nicht ausgenommen.

4. In den Nieren findet man sehr wenig variierende Werte für das freie Cholesterin, sowohl bei normalen als kranken Individuen. Die Werte für das als Ester gebundene Cholesterin sind sowohl bei meinen normalen Fällen als bei den von mir untersuchten Fällen von Diabetes, perniziöser Anämie, Lebercirrhose oder Sepsis, wenig variierend und überall sehr niedrig, dagegen zeigen Nierenkrankheiten Werte für das gebundene Cholesterin, die beträchtlich höher sind als normal.

5. In den Nebennieren findet man unbedeutende Variationen des Gehaltes an freiem Cholesterin; dagegen wechselt der Gehalt an gebundenem Cholesterin höchst beträchtlich in den verschiedenen Fällen. Die höchsten Werte findet man in zwei Fällen von Nierenkrankheit und in einem normalen Falle. Diese hohen Werte bei Nierenkrankheit sind nicht als eine pathologische Erhöhung zu betrachten, sondern sie sind in die physiologischen Variationen einzureihen.

6. In keinem meiner Fälle konnte morphologisch Cholesterin in der Leber nachgewiesen werden.

7. Bei länger dauernden Nierenkrankheiten findet man in den Nieren morphologisch Cholesterinester, und zwar in einem Gehalt, der sehr gut dem quantitativen chemischen Gehalt entspricht.

8. Betreffs der Nebennieren ist es nicht möglich, den Gehalt an Cholesterinestern morphologisch zu schätzen; nur die quantitative chemische Untersuchung gibt eine sichere Auffassung von dem wirklichen Gehalt an diesen Stoffen.

Digitized by Google

Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide. XXIII.

Das Acidalbumin.

Von

Mona Adolf und Ernst Spiegel.

(Aus dem Laboratorium für physikalisch-chemische Biologie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 9. Dezember 1919.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

Unsere Kenntnis vom Acidalbumin reicht kaum über die Art seiner Darstellung und sein Verhalten zu Wasser, Säuren und Laugen hinaus. Wir wissen nur, daß die Veränderung durch die Säure nicht so tief greift wie bei jener Einwirkung von Alkali, die zur Bildung des Alkalialbuminats führt. Im letzteren Falle ist eine Abgabe von Stickstoff und namentlich eine Abspaltung von Schwefel sichergestellt. Dagegen ist nicht einmal die alte Angabe [Nasse[1])], daß die Acidalbuminbildung mit einer Stickstoffabsprengung einhergeht, bestätigt. Wir müssen auch heute die Möglichkeit zugeben, daß das Acidalbumin nicht ein einheitliches Produkt darstellt, und daß selbst bei dem gleichen Ausgangsmaterial je nach dem Grade der Säureeinwirkung, auch wenn diese nicht bis zu einem tieferen Abbau gesteigert wird, verschiedene Arten „Acidalbumine" nebeneinander entstehen könnten. Unter diesen Umständen muß sich die Definition des Acidalbumins darauf beschränken, dasselbe als ein denaturiertes Albumin zu bezeichnen, das schon in geringem Überschusse von Alkali, aber auch von Säure leicht löslich ist, während seine Neutralteile sowohl in Wasser als auch in Salzlösungen unlöslich sind. Vom Alkalialbuminat würde es schon durch dessen stärkere chemische Abweichung vom Stammalbumin, vom hitzedenatu-

[1]) Nasse, Arch. f. d. ges. Physiol. **7**, 139. 1872.

Digitized by Google

rierten Eiweiß durch dessen schwere Löslichkeit in Säuren abgegrenzt sein.

Gerade wegen der Schwierigkeit, hier auf chemischem Wege zu einer schärferen Charakterisierung zu kommen, schien es von Interesse, das Acidalbumin in physikalisch-chemischer Hinsicht näher zu untersuchen.

Darstellung: Nach einigen orientierenden Vorversuchen erwies sich folgende Art der Darstellung als die rationellste. 500 ccm weitgehend dialysiertes, durch Jahre abgelagertes Rinderserum werden vorsichtig mit 20 ccm n-HCl versetzt, darauf bis zum Sieden erhitzt und mit n-NaOH neutralisiert bis das Maximum der Ausflockung des Acidalbumins erreicht ist. Der nach kurzem Stehen sich absetzende Niederschlag wird von der darüberstehenden Flüssigkeit getrennt; diese kann mit der aliquoten Menge Salzsäure in der gleichen Weise nochmals behandelt werden, ein Vorgang, der sich 2—3 mal wiederholen läßt, bis alles Albumin in Acidalbumin übergeführt ist. Die Niederschläge werden gesammelt und so lange mit destilliertem Wasser gewaschen, bis im Filtrat kein Cl mehr nachweisbar ist.

Die Hälfte des dargestellten Acidalbumins wird in 200 ccm Wasser suspendiert und durch Zusatz von 40 ccm 0,1 n-HCl zur Lösung gebracht (Trockengehalt dieser Lösung = 1,123%); die andere Hälfte wird ebenfalls in 200 ccm H_2O aufgeschwemmt und mit 20 ccm 0,1 n-NaOH versetzt (Trockengehalt 1,39%). Diese Lösungen wurden unter Toluol aufbewahrt und bildeten die Stammlösungen für die folgenden Versuche.

Die erste Frage, die sich aufdrängte, war die, ob sich das genuine Protein durch die Denaturierung mit HCl, rücksichtlich seiner Säure resp. Lauge bindenden Valenzen, geändert habe. Es wurde daher eine Lösung des Acidalbumins mit steigenden Konzentrationen Lauge bzw. Säure versetzt und ihre H-Ionenkonzentration bestimmt. Die gefundenen Werte sind in Tabelle I und II wiedergegeben; in diesen bedeutet P_H, bzw. P_{OH} den H, resp. OH-Exponenten, C_H die H-Ionenkonzentration, C_{OH} die Konzentration der OH-Ionen, α den Dissoziationsgrad unter der Voraussetzung, daß sich die ursprüngliche Dissoziation der Lauge durch den teilweisen Ersatz der Lauge durch das Eiweißsalz nicht wesentlich ändert.

Wie aus Abb. 2 und 1 hervorgeht, zeigt die Kurve des Säure- und Laugenbindungsvermögens denselben typischen Verlauf, wie ihn Pauli und seine Schüler für andere Eiweißkörper dargestellt haben. Aus der Kurve des Laugenbindungsvermögens ergibt sich, daß 1 g Acidalbumin maximal 2,5 Millimol NaOH

Digitized by Google

Tabelle I. (Abb. 1.)

Acidalbumin (AA) + NaOH. Endkonzentration des AA = 0,69%.

n-Konzentration der NaOH	P_H	P_{OH}	C_{OH}	$C_{NaOH} = \frac{C_{OH}}{\alpha}$	Gebund. NaOH $n - C_{NaOH}$
0,0045	9,5714	4,4936	$3{,}21 \times 10^{-5}$	$3{,}45 \times 10^{-5}$	$4{,}465 \times 10^{-3}$
0,0095	10,5456	3,5194	$3{,}02 \times 10^{-4}$	$3{,}30 \times 10^{-4}$	$9{,}17 \times 10^{-3}$
0,0145	11,4131	2,6519	$2{,}23 \times 10^{-3}$	$2{,}46 \times 10^{-3}$	$1{,}204 \times 10^{-2}$
0,0245	11,9277	2,1373	$7{,}29 \times 10^{-3}$	$8{,}15 \times 10^{-3}$	$1{,}635 \times 10^{-2}$
0,0445	12,4286	1,6364	$2{,}31 \times 10^{-2}$	$2{,}65 \times 10^{-2}$	$1{,}80 \times 10^{-2}$
0,0545	12,4940	1,5710	$2{,}69 \times 10^{-2}$	$3{,}09 \times 10^{-2}$	$1{,}72 \times 10^{-2}$

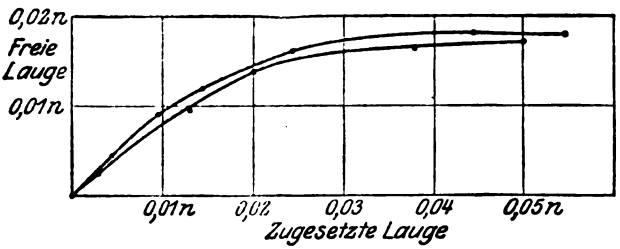


Abb. 1. Die obere Kurve entspricht dem 0,69% Acidalbumin, die untere Kurve entspricht dem 0,62% Rinderserumalbumin.

Tabelle II. (Abb. 2.)

Acidalbumin (AA) + Salzsäure. Endkonzentration des AA = 0,62%.

n-Konzentration der HCl	P_H	C_H	$C_{HCl} = \frac{C_H}{\alpha}$	Gebundene Säure $n - \frac{C_H}{\alpha}$
0,008	2,7487	$1{,}78 \times 10^{-3}$	$1{,}83 \times 10^{-3}$	$6{,}17 \times 10^{-3}$
0,013	2,3442	$4{,}53 \times 10^{-3}$	$4{,}70 \times 10^{-3}$	$8{,}30 \times 10^{-3}$
0,018	2,0999	$7{,}94 \times 10^{-3}$	$8{,}27 \times 10^{-3}$	$9{,}73 \times 10^{-3}$
0,028	1,7813	$1{,}65 \times 10^{-2}$	$1{,}73 \times 10^{-2}$	$10{,}7 \times 10^{-3}$
0,038	1,5903	$2{,}57 \times 10^{-2}$	$2{,}71 \times 10^{-2}$	$10{,}9 \times 10^{-3}$
0,048	1,4638	$3{,}44 \times 10^{-2}$	$3{,}66 \times 10^{-2}$	$11{,}4 \times 10^{-3}$
0,058	1,3821	$4{,}15 \times 10^{-2}$	$4{,}43 \times 10^{-2}$	$12{,}6 \times 10^{-3}$

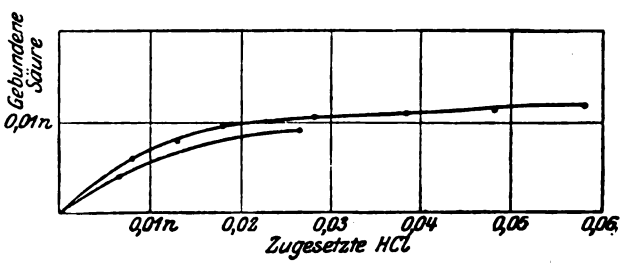


Abb. 2. Die obere Kurve entspricht einer Acidalbuminlösung von 0,62% Gehalt; die untere einer Rinderserumlösung von 0,68%, welche der Arbeit von Pauli & Hirschfeld (l. c.) entnommen wurde.

Digitized by Google

bindet, also unter diesen Umständen dem Acidalbumin ein Äquivalentgewicht von 416 zukommt. Da dem nativen Serumalbumin nach anderweitigen Versuchen eine Maximalaufnahme von 2,4 Millimol Lauge für 1 g Trockengewicht zukommt, so kann der Satz ausgesprochen werden, daß bei der Acidalbuminbildung das Basenbindungsvermögen des Proteins ungeändert bleibt.

Was die Säurebindung des Albumins betrifft, konnten wir aus der Arbeit von Pauli und Hirschfeld[1]) (Tabelle 14, Abb. 9 dieser Arbeit) entnehmen, daß die Werte $1{,}66 \cdot 10^{-3}$ g äquivalente HCl für 1 g Serumalbumin betragen. Der entsprechende Wert für Acidalbumin ergibt $2{,}06 \cdot 10^{-3}$ g äquivalente HCl, liegt also um 20% höher. Wir dürfen daraus entnehmen, daß durch die Behandlung mit schwacher Säure in der Wärme noch etwa ein Fünftel mehr basischer Valenzen des Albumins frei gemacht werden, die nunmehr auch bei niederer Temperatur Säure aufnehmen können. Diese irreversible Steigerung der Säure-Kapazität des Albumins scheint ein charakteristisches Merkmal der Acidalbuminbildung darzustellen.

Auch die Kurve der inneren Reibung (Abb. 3 und 4, Tabelle III, IV), die wir in der üblichen Weise gemessen haben (vgl. Schorr)[2]), zeigt, daß sich hier die gleiche Abhängigkeit von der zugesetzten Säuren- oder Laugenkonzentration wie beim nativen Eiweiß (Tab. V, VI) wiederholt, daß demnach die gleichen Veränderungen der Ionisation wie bei diesem anzunehmen sind, also eine Zunahme mit steigendem Zusatz, dann Zurückdrängung im Überschuß. Die Werte für die innere Reibung der Acidalbuminlösung liegen höher als die entsprechenden Werte des genuinen Proteins, was sich jedoch ebenso wie die Verschiebung des Maximums in etwas höhere Säurekonzentration ohne Schwierigkeit aus der gesteigerten Säurebindung beim Acidalbumin erklärt.

Bei der allgemeinen Übereinstimmung im physikalisch-chemischen Verhalten des Acidalbumins mit dem seiner Muttersubstanz, waren analoge Verhältnisse bezüglich der optischen Drehung zu erwarten. Seinerzeit hatten Pauli und Samec[3]) gezeigt, daß das Drehungsvermögen des Albumins bei Säuren- oder

[1]) W. Pauli und M. Hirschfeld, diese Zeitschr. **62**, 245. 1914.
[2]) C. Schorr, diese Zeitschr. **37**, 224, 1911.
[3]) W. Pauli und M. Samec, diese Zeitschr. **59**, 470. 1914.

Digitized by Google

Tabelle III.

Acidalbumin + NaOH. Temp. 25°. Endkonzentration des AA = 0,69%. Wasserwert $t_0 = 606$.

n-Konzentration der NaOH	Durchströmungszeit (t) in $^1/_5$ Sek.	$\frac{t}{t_0}$	Korrigiertes $\frac{t}{t_0}$ (nach Abzug des Wertes für reine NaOH)
0,0045	698	1,152	1,152
0,0095	712	1,175	1,174
0,0145	731	1,207	1,204
0,0195	755	1,247	1,243
0,0245	755	1,247	1,242
0,0295	746	1,232	1,226
0,0445	720	1,205	1,195
0,0545	720	1,205	1,193

Tabelle IV.

Acidalbumin (AA) + HCl. Temp. 25°. Endkonzentration des AA = 0,62%.

n-Konzentration der HCl	t in $^1/_5$ Sek.	$\frac{t}{t_0}$ ($t_0 = 606$)
0,008	699	1,154
0,013	725	1,196
0,018	702	1,158
0,028	688	1,135
0,048	668	1,103
0,058	668	1,103

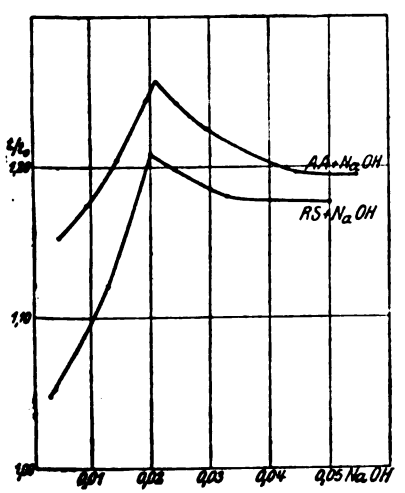


Abb. 3.

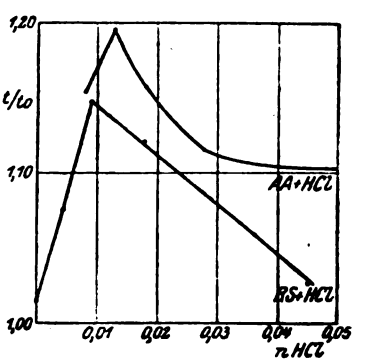


Abb. 4.

Digitized by Google

Laugenzusatz bis zu einem Maximum ansteigt, welches dem Maximum der H- oder OH-Ionenbindung entspricht, wogegen die Zurückdrängung der Ionisation durch steigenden Säuren- oder Laugenzusatz, die sich in einem Abfall der Reibungskurve äußert, auf

Tabelle V.

Rinderserum (RS) + NaOH. Endkonzentration des RS = 0,75%. Wasserwert $t_0 = 606$.

n-Konzentration der NaOH	Durchströmungszeit (t) in $^1/_5$ Sek.	$\frac{t}{t_0}$	Korrigiertes $\frac{t}{t_0}$ (nach Abzug des Wertes für reine NaOH)
0,0033	635	1,048	1,048
0,0133	680	1,122	1,121
0,02	733	1,209	1,207
0,033	720	1,188	1,181
0,05	720	1,188	1,176

Tabelle VI.

Rinderserum (RS) + HCl. Temp. 25°. Endkonzentration des RS = 0,62%. Wasserwert $t_0 = 606$.

n-Konzentration der HCl	Durchströmungszeit (t) in $^1/_5$ Sek.	$\frac{t}{t_0}$
0	615	1,014
0,0045	651	1,075
0,0091	694	1,145
0,0182	681	1,123
0,0364	655	1,080
0,045	644	1,062

Tabelle VII.

Acidalbumin (AA) + HCl. Endkonzentration des AA = 0,62%.

	n-Konzentration der HCl	α
5 ccm AA (in HCl gelöst)	0,008	−0,29
	0,028	−0,33
	0,058	−0,49
	0,079	−0,33
	0,108	−0,29

den Verlauf der Kurve der optischen Drehung ohne Einfluß bleibt. In unseren Versuchen zeigte sich jedoch, daß das Acidalbumin eine besondere Stellung einnimmt, da sich ein deutliches Optimum des Drehungsvermögens etwa entsprechend einer

Digitized by Google

Tabelle VIII.

Acidalbumin (AA) + NaOH. Endkonzentration des AA = 0,69%.

n-Konzentration der NaOH	α
0,0245	−3,13
0,0545	−3,21
0,1045	−3,04

Säurekonzentration von 0,058 n-HCl nachweisen ließ. Bei Überschreiten dieser Konzentration nimmt das Drehungsvermögen des Acidalbumins wieder ab und strebt dem Ausgangswert zu. (Vgl. Abb. 5 und Tabelle VII.) Bei der Lauge konnte ein ähnliches Verhalten (Tabelle VIII) nicht mit Sicherheit festgestellt werden, da infolge Trübung der Eiweißlösung bei zunehmender Laugenkonzentration genaue Werte der optischen Drehung in genügend viel Zwischenstufen nicht zu ermitteln waren. Für unser Rinderserumeiweiß konnten wir dasselbe Verhalten, welches Pauli und Samec gefunden haben, selbst bis zu einer Säurekonzentration von

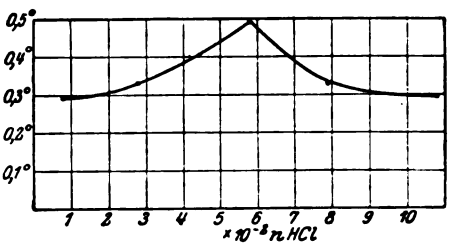


Abb. 5.

Tabelle IX.

Rinderserum + HCl.

n-Konzentration der HCl	α
0	−2,37
0,05	−2,60
0,10	−2,61

0,1 n-HCl, bestätigen. (Tabelle IX.) Der Vergleich mit dem genuinen Rinderserumeiweiß ergab auch, daß dieses als Säureeiweiß ein wesentlich höheres Drehungsvermögen besitzt als das Acidalbuminsalz mit Säure.

Dagegen scheint die relative Erhöhung durch den Säurezusatz in beiden Fällen nicht wesentlich verschieden zu sein.

Digitized by Google

Die Form der Drehungskurve beim Acidalbumin stimmt mit der der inneren Reibung überein, doch liegt das Drehungsoptimum bei einer Säurekonzentration von über 0,05 n, während das Reibungsoptimum etwa bei 0,013 n-HCl gelegen ist. — Der Drehungsabfall kann deshalb nicht auf jener Ionisationszurückdrängung beruhen, welche dem Abstieg der Reibungskurve entspricht. —

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes erwies sich die Lösung von Acidalbumin in Säure resp. Lauge ungeeignet

Tabelle X.

Bestimmung des isoelektr. Punktes. Puffer + Acidalbumin in HCl gelöst. (10 : 0,25.)

Puffer	Na-Acetat / Essigsäure	H-Ionenkonzentration	Reaktion
I.	5 : 2	$7{,}2 \times 10^{-6}$	Gleichmäßig starke Flockung.
II.	10 : 3	$5{,}4 \times 10^{-6}$	
III.	5 : 1	$3{,}6 \times 10^{-6}$	
IV.	10 : 1	$1{,}8 \times 10^{-6}$	
V.	25 : 2	$1{,}44 \times 10^{-6}$	
VI.	50 : 3	$1{,}08 \times 10^{-6}$	
VII.	50 : 2	$0{,}72 \times 10^{-6}$	
VIII.	50 : 1	$0{,}36 \times 10^{-6}$	
IX.	100 : 1	$0{,}18 \times 10^{-6}$	

Tabelle XI.

Puffer + Acidalbumin HCl gelöst. (10 : 0,25.)

Puffer	NH_4Cl / NH_4OH	OH-Ionenkonzentration	Reaktion
I.	100 : 1	$1{,}8 \times 10^{-7}$	+
II.	50 : 1	$3{,}6 \times 10^{-7}$	++ sofortiges Auftreten zarter Trübung.
III.	50 : 2	$7{,}2 \times 10^{-7}$	++
IV.	50 : 4	$14{,}4 \times 10^{-7}$	+

(Tabelle X und XI), da diese Lösungen nicht das neutrale Acidalbumin darstellen. Es wurde daher versucht, das gefällte Acidalbumin direkt in $^n/_{20}$-Natriumacetatlösung zu lösen, ähnlich, wie dies Michaelis und Pechstein[1]) für das Kasein angaben. Doch gelang es nicht, das Acidalbumin in solcher Menge zur Lösung zu bringen, daß eine positive Biuretreaktion zu erzielen war, so daß auf die Bestimmung des isoelektrischen Punktes verzichtet werden mußte.

[1]) L. Michaelis und H. Pechstein, diese Zeitschr. 47, 260. 1912.

Digitized by Google

Zur Ermittlung der Wanderungsgeschwindigkeit und Wertigkeit des Acidalbuminations wurde der Eiweißkörper nach der eingangs beschriebenen Methode dargestellt, im Vakuum getrocknet und in 0,03 n-NaOH durch 24 Stunden geschüttelt, wobei 2,69 g in 100 ccm Lauge in Lösung gingen. Leider reichte die vorhandene Materialmenge nicht zur völligen Sättigung bei einem Überschuß der festen Phase. Zur Entscheidung, ob die Leitfähigkeit des Acidalbumins durch das Trocknen sich nicht wesentlich verändert habe, wurde dasselbe gleich nach Menge der Fällung feucht in der zur Lösung gerade ausreichenden n-NaOH durch Zutropfen aus einer Pipette gelöst und die Lösung mit destilliertem Wasser so weit verdünnt, daß die Laugenkonzentration 0,0092 n-NaOH betrug. Der in Abb. 6 dargestellte

Tabelle XII.

Leitfähigkeit von getrocknetem Acidalbumin (AA in $\frac{3\,n}{100}$ NaOH gelöst). Temp. = 25° C. Bei sämtlichen Werten ist die Leitfähigkeit des Wassers und der Anteil der freien Lauge korrigiert.

Acidalbumin %	v	C_{OH}	$\varkappa$	$\varkappa_{korrigiert}$	Λ
2,69	33,3	$6{,}37 \times 10^{-5}$	$171{,}0 \times 10^{-5}$	$168{,}6 \times 10^{-5}$	56,2
1,34	66,6	$5{,}14 \times 10^{-5}$	$100{,}35 \times 10^{-5}$	$98{,}27 \times 10^{-5}$	65,4
0,67	133,2	$1{,}31 \times 10^{-5}$	$55{,}26 \times 10^{-5}$	$54{,}21 \times 10^{-5}$	72,28
0,34	266,4		$30{,}06 \times 10^{-5}$	$29{,}16 \times 10^{-5}$	77,6
0,17	532,8	$3{,}72 \times 10^{-6}$	$16{,}56 \times 10^{-5}$	$15{,}76 \times 10^{-5}$	84,0
	1032,0				87,0
	∞				92,0

Verlauf der Leitfähigkeit des getrockneten Acidalbumins (der Tabelle XIII entnommen) und des feucht verwendeten (vgl. Tabelle XIV) ergibt, daß dieser Eiweißkörper durch das Trocknen in seiner Leitfähigkeit nicht verändert worden ist[1]). Die Leitfähigkeitskurven fallen in den zugehörigen Abschnitten fast vollständig zusammen.

Aus der in Abb. 6 dargestellten Kurve berechnet sich die Wertigkeit nach der bekannten Regel von Ostwald $\lambda_{1024} - \lambda_{32} = 10\,n$,

[1]) Nur das Laugenbindungsvermögen des Acidalbumins scheint durch das Trocknen zugenommen zu haben. Denn die gesättigte Lösung von AA in 0,03 n-NaOH hat einen Gehalt an freien OH-Ionen von $6{,}37 \times 10^{-5}$, die Lösung des feucht dargestellten AA in 0,0092 n-NaOH dagegen von $5{,}93 \times 10^{-4}$. Wobei allerdings die geringe Steigerung der hydrolytischen Dissoziation und der Verdünnung in Rechnung zu ziehen ist.

Digitized by Google

Tabelle XIII.

Leitfähigkeit des feucht dargestellten Acidalbumins. (AA in 0,0092 n-NaOH gelöst.) Temp. = 25° C.

Acidalbumin %	v	$\varkappa_{\text{korrigiert}}$	Λ
1,38	108,6	$60{,}67 \times 10^{-5}$	67,4
0,69	217,2	$35{,}52 \times 10^{-5}$	78,8
0,34	434,4	$18{,}28 \times 10^{-5}$	81,2
0,17	868,8	$9{,}65 \times 10^{-5}$	85,6

worin n die Wertigkeit bedeutet mit 87,0 — 56,0 = 31,0 = 10,3 also als eine dreifache. Das negative Acidalbumination hätte danach dieselbe Valenz wie das Kaseination (Pauli und Matula)[1]).

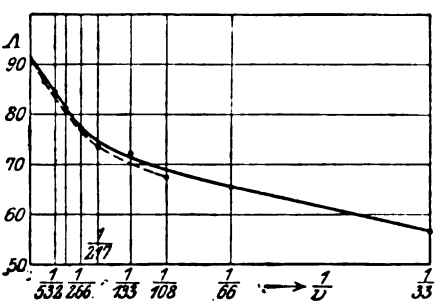


Fig. 6. Die ausgezogene Kurve entspricht dem getrockneten, die gestrichelte dem ungetrockneten Acidalbumin.

Für die Ionenbeweglichkeit $V_{AA} = \lambda_\infty - U_{Na}$ erhalten wir 41,1, wenn wir für $U_{Na} = 50{,}9$ und für λ_∞ den extrapolierten Wert 92 einsetzen. Vergleichen wir diese Größe mit der des dreiwertigen Kaseinations 30,1, so ergibt sich, daß das Acidalbumination eine größere Wanderungsgeschwindigkeit aufweist.

Es muß besonderen Untersuchungen vorbehalten sein, zu entscheiden, inwieweit hier Unterschiede der Molekülgröße oder solche der Hydratation mitspielen.

Nachdem Pauli und Matula[1]) am Kasein gezeigt haben, daß bei fortschreitendem Laugenzusatz die Äquivalentleitfähigkeit des maximal mit Kasein gesättigten Kaseinats bis zur Verdünnung mit der gleichen Lauge auf die Hälfte nur allmählich ansteigt, weiterer Laugenzusatz dagegen eine jähe Erhebung der Äquivalentleitfähigkeit bewirkt, schien es von Interesse, ob sich ähnliche Verhältnisse bei dem Acidalbumin wiederholten. Dieser Untersuchung stellte sich jedoch die Schwierigkeit entgegen, daß eine so konzentrierte Lösung, wie sie die genannten Autoren von Kasein dargestellt haben, nicht zu gewinnen war. Die Folge davon war, daß schon beim Zusatz des halben Volumens

[1]) W. Pauli und J. Matula, diese Zeitschr. **99**, 219.

Digitized by Google

Tabelle XIV.

Acidalbumin in 0,03 n-NaOH gelöst, fortschreitend mit NaOH verdünnt. Temp. 25° C.

Acidalbumin %	v	C_{OH}	$\varkappa$	$\varkappa_{korrigiert}$	Λ
1,79	33,3	$0{,}54 \times 10^{-5}$	$300{,}0 \times 10^{-5}$	$296{,}74 \times 10^{-5}$	98,9
0,89	66,6		$161{,}9 \times 10^{-5}$	$160{,}0 \times 10^{-5}$	106,6
0,45	133,2		$84{,}4 \times 10^{-5}$	$83{,}1 \times 10^{-5}$	110,8
0,22	266,4		$44{,}2 \times 10^{-5}$	$43{,}2 \times 10^{-5}$	115,2
0,11	532,8	$3{,}37 \times 10^{-6}$	$22{,}84 \times 10^{-5}$	$22{,}05 \times 10^{-5}$	117,6

Tabelle XV.

Acidalbumin in 0,03 n-NaOH gelöst, fortschreitend mit NaOH verdünnt. Temp. 25° C.

Acid-albumin %	Relative Eiweißkonzentration	C_{OH}	$\varkappa_{korrigiert}$	Λ
2,69	1,00	$6{,}37 \times 10^{-5}$	$168{,}6 \times 10^{-5}$	56,2
1,35	0,50		$291{,}0 \times 10^{-5}$	97,0
1,076	0,40		$302{,}0 \times 10^{-5}$	100,6
0,81	0,32		$331{,}0 \times 10^{-5}$	110,3
0,67	0,25		$347{,}0 \times 10^{-5}$	116,0
0,54	0,20	$6{,}25 \times 10^{-4}$	$382{,}43 \times 10^{-5}$	124,1

0,03 n-NaOH-Lösung zu unserer 2,69 proz. Acidalbuminlösung in 0,03 n-NaOH ein beträchtlicher Anstieg der Leitfähigkeit konstatiert werden konnte. (Tab. XIV.) Diesen Anstieg durch eine Änderung in der Wertigkeit der Eiweißionen zu erklären, geht darum nicht an, weil diese Lösung infolge ihres relativ geringen Eiweißgehaltes eine OH-Konzentration von $9{,}54 \times 10^{-5}$ aufwies. Wegen des starken Einflusses freier Lauge dürfte dieser Versuch nicht mehr als Leitfähigkeitskurve eines neutralen Natriumsalzes aufzufassen und als Grundlage einer Wertigkeitsbestimmung zu verwenden sein. Dagegen konnten auch wir finden, daß weiterhin ähnlich wie beim Kasein, die fortschreitende Verdünnung mit 0,03 n-NaOH ein rapides Ansteigen der Leitfähigkeit bewirkt (Tab. XV, Abb. 7), so daß wenigstens in diesem Belang ähnliche Verhältnisse wie beim Kasein zu bestehen schei-

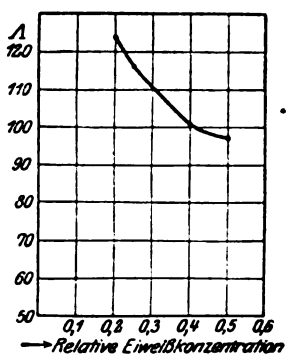


Abb. 7.

Digitized by Google

nen, für welches Pauli und Matula aus dem knickartig einsetzenden, steilen Anstieg der Leitfähigkeit eine neue Erschließung saurer Valenzen durch freie OH-Ionen und damit eine Erhöhung der Wertigkeit abgeleitet haben.

Allerdings ist zu bedenken, daß sich auch bei unserem Versuche die Laugenkonzentration zwischen $6{,}37 \times 10^{-5}$ und $6{,}25 \times 10^{-4}$ bewegte. Es wurde darum versucht, durch mehrtägiges Schütteln von getrocknetem Acidalbumin in 0,01 n-NaOH und Abzentrifugieren des nicht in Lösung gegangenen Überschusses eine sicher gesättigte Lösung von Acidalbumin zu erreichen. Doch auch diese Lösung wies bei einem Trockengehalt von 1,38% einen Gehalt an freien OH-Ionen von $1{,}46 \times 10^{-4}$ auf, welcher bei Zusatz von $^1/_4$ Volumen 0,01 n-NaOH auf $4{,}71 \times 10^{-4}$ anstieg. Dazu stimmt es, daß das Maximum der Laugenbindung für eine 0,69proz. Acidalbuminlösung (Tabelle I) bei $1{,}8 \times 10^{-2}$ liegt, während bei der gleichen Konzentration der zugesetzten Lauge (0,045 n) schon eine 0,45proz. Kaseinlösung 0,0189 n-NaOH bindet[1]). Es war daher nicht möglich, die von Pauli und Matula beim Kasein gefundene Leitfähigkeitskurve für fortschreitenden Laugenzusatz in ihrem ersten, schwach ansteigenden Anteil zu reproduzieren. Immerhin scheint sich aus dem Vergleich der Leitfähigkeitskurve des getrockneten und des feucht dargestellten Acidalbumins (Tab. XII und XIII) der Hinweis dafür zu ergeben, daß die von den genannten Autoren am Kasein gefundene Gesetzmäßigkeit auch für das Acidalbumin zutrifft. Berücksichtigen wir nämlich den verschiedenen Eiweißgehalt dieser beiden Lösungen, so finden wir beispielsweise, daß in Tabelle XIII bei einer Literverdünnung von 108,6 der Eiweißgehalt 1,38% beträgt. Derselben Normalität an Lauge würde aber in Tabelle XII bei annähernd gleicher Äquivalentleitfähigkeit bloß ein Eiweißgehalt von 0,82% entsprechen, wie sich durch eine einfache Interpolation ergibt, so daß tatsächlich in diesem Bereiche nur eine geringe Änderung der Äquivalentleitfähigkeit bei verschiedenem Eiweißgehalt erfolgt.

Bei der Prüfung der Fällbarkeit durch Schwermetallsalze zeigte sich die auffallende Tatsache, daß die Lösung von Acidalbumin in HCl durch $CuSO_4$ resp. $ZnSO_4$ von 1 n- bis 0,0001 n-Konzentration nicht gefällt wird, während sich am Rinder-

[1]) W. Pauli und J. Matula, diese Zeitschr. **99**, Tab. VI, Abb. 2.

Digitized by Google

Tabelle XVI.

n-Konzentration des $ZnSO_4$	Fällung		Rinderserum (Endkonzentration = 0,56%)
	AA in NaOH gelöst (Endkonzentration des AA = 0,69%)	AA in HCl gelöst (Endkonzentration des AA = 0,62%)	
$\frac{2}{3}$	+ löst sich teilweise	θ	++
2	+ gelatinös	θ	++
1	++	θ	+
0,5	++	θ	schwache Trübung
0,25	++	θ	θ
0,125	++	θ	θ
0,0625	++	θ	θ
0,03123	++	θ	schwache Trübung
0,01563	++	θ	schwache Trübung
0,0078	++	θ	θ
0,0039	++	θ	θ
0,00195	++	θ	θ
0,00097	+ gelatinös	θ	θ
0,00048	θ	θ	θ
0,00024		θ	θ

serum die typischen, von Pauli[1]) resp. Pauli und Flecker[2]) gefundenen Fällungszonen, die eine bei niedriger, die andere bei hoher Salzkonzentration reproduzieren ließen. Die Vermutung,

Tabelle XVII.

n-Konzentration des $CuSO_4$	Fällung		RS (Endkonzentration = 0,56%)
	AA in NaOH gelöst (Endkonzentration des AA = 0,69%)	AA in HCl gelöst (Endkonzentration des AA = 0,62%)	
1,0	θ	θ	
0,5	+++	θ	
0,25	+++	θ	+
0,125	+++	θ	+
0,0625	+++	θ	++
0,03	+++	θ	+
0,015	+++	θ	+
0,007	+++	θ	zarte Trübung
0,003	+++	θ	
0,001	+++	θ	
0,0005	+++	θ	+
0,0002	θ	θ	+
0,0001	θ	θ	+
0,00005	θ	θ	+
0,00002	θ	θ	+
0,00001	θ	θ	+

[1]) W. Pauli, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **6**, 233. 1905.
[2]) W. Pauli und L. Flecker, diese Zeitschr. **41**, 461. 1912.

Digitized by Google

daß die Anwesenheit der Salzsäure es ist, welche die Fällung hemmt, wurde bestätigt, denn die Lösung des Acidalbumins in NaOH zeigte mit $CuSO_4$ und $ZnSO_4$ zwischen den in Tabelle XVI und XVII angegebenen Grenzen deutliche Ausflockung. Es ergibt sich daraus, daß die Fällung von Eiweiß durch Schwermetall eine Reaktion allein auf das negative Proteinion darstellt; diese Tatsache tritt beim Acidalbumin aus dem Grunde mit besonderer Deutlichkeit hervor, weil dieses nur als Ion löslich ist, sie folgt aber auch schon aus den Untersuchungen von Pauli und Flecker, welche die hemmende Wirkung eines Säureüberschusses auf die Schwermetallsalzfällung am genuinen Protein nachgewiesen haben.

Zusammenfassung.

1. Bei der Umwandlung des Serumalbumins zu Acidalbumin ändert sich infolge der Einwirkung von Salzsäure bei Siedehitze das Eiweißmolekül nur in seinem Säure- nicht aber in seinem Laugebindungsvermögen. Aus der Kurve des Laugenbindungsvermögens ergibt sich, daß 1 g Acidalbumin maximal 2,5 Millimol NaOH bindet, also in diesem Falle dem Acidalbumin ein Äquivalentgewicht von 416 zukommt. Der gleiche Wert findet sich beim nativen Serumalbumin. Dagegen liegt das Säurebindungsvermögen des Acidalbumin um 20% höher als beim genuinen Albumin.

2. Die Werte für die innere Reibung der Acidalbuminlösung liegen zwar höher als die parallelen Werte des genuinen Proteins, entsprechend dem gesteigerten Säurebindungsvermögen, zeigen sie bei Säure- oder Laugenzusatz die gleichen Veränderungen, so daß auch die gleichen Prozesse der Ionisationsbeeinflussung bei Säure- und Laugenzusatz anzunehmen sind.

3. Dagegen kommt dem Acidalbumin bezüglich der optischen Drehung eine besondere Stellung zu. Es läßt sich bei Säurezusatz ein deutliches Optimum des Drehungsvermögens bei einer Säurekonzentration von 0,058 n-Salzsäure nachweisen, während bei höherer Salzsäurekonzentration der Wert der optischen Drehung wieder abnimmt. Vom Albumin dagegen ist bekannt, daß sein Drehungsvermögen bei Laugen- oder Säurezusatz ein Maximum erreicht, welches dem Maximum der H- oder OH-Bindung entspricht und für eine 1 proz. Lösung bei einem Säureüberschuß

Digitized by Google

selbst von 0,1 n-Salzsäure beibehalten wird. Das Drehungsoptimum des Acidalbumins fällt nicht mit dem durch die Reibungskurve angezeigten Ionisationsmaximum zusammen, sondern liegt bei einem wesentlich höheren Säurezusatz, bei welchem die Reibung vollständig abgefallen ist.

4. Das Acidalbumin im neutralen Salz ist nach Leitfähigkeitsmessungen dreiwertig und hat eine Wanderungsgeschwindigkeit $V = 41{,}1$.

5. Schwermetallsalze fällen wohl das in NaOH, aber nicht das in HCl gelöste Acidalbumin. Die Schwermetallsalzfällung stellt also nur eine Reaktion auf das negative Proteinion dar.

Digitized by Google

Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide. XXIV[1].

Die Fällung von Eiweiß durch Säuren und Laugen.

Von

Richard Wagner.

(Aus dem Laboratorium für physikalisch-chemische Biologie der Universität Wien.)

(Eingegangen am 29. Dezember 1919.)

Mit 1 Abbildung im Text.

I. Überblick über die Versuchsergebnisse.

Nach der von Pauli und seinen Schülern entwickelten Lehre kommt es beim Zusammenbringen von Säuren oder Laugen mit Eiweiß zur Entstehung von Eiweißsalzen, welche das Säureanion bzw. das Metallion in ionogener Bindung enthalten und positive oder negative, im allgemeinen mehrwertige Eiweißionen bilden. Diese Eiweißionen sind stark hydratisiert und dementsprechend durch eine hohe Viscosität ausgezeichnet, und, da nur elektrisch-neutrale Teilchen aus einer Lösung abgeschieden werden können, so ist auch das Eiweiß im ionischen Zustande weder durch Hitze noch durch Alkohol koagulabel. Eine Zurückdrängung der Eiweißionisation findet erst im Überschusse der zugesetzten Säure infolge der Vermehrung der Konzentration des der Säure und dem Eiweißsalze gemeinsamen Anions statt. Diese Ionisationsabnahme prägt sich in einem Wiederauftreten

[1]) Die vorliegende Untersuchung stammt aus den Jahren 1909—10 und ihre wichtigsten Ergebnisse sind nur ganz kurz von W. Pauli und R. Wagner in einer Mitteilung an die Akademie der Wissenschaften (Akad. Anzeiger, Sitz.-Ber. d. math.-nat. Kl. 17. III. 1910) veröffentlicht worden. Auch die späteren Arbeiten über die Säurebindung an das Eiweiß aus dem Institute haben keinerlei Widerspruch mit der im Jahre 1910 aufgestellten Theorie der Säurefällung von Eiweiß aufgedeckt.

Digitized by Google

der Alkohol- und Hitzegerinnbarkeit und in einem Abfall der inneren Reibung aus.

Man kann nun den in höheren Säurekonzentrationen auftretenden Reibungswert als Ausdruck entsprechender Ionisations- und Hydratationsverhältnisse des Eiweißes betrachten. Dann wird hier die Reihenfolge der Säuren nach ihrer die Reibung des Eiweißsalzes herabmindernden Wirkung auch die Ordnung der neutralen Eiweißsalzteilchen nach ihrer Konzentration und abnehmenden Hydratation bedeuten. Pauli stellte nun die Hypothese auf, daß die Fällung von Eiweiß durch hohe Säurekonzentration primär als die Verdrängung eines Eiweißsalzes aus der Lösung durch Steigerung der Neutralteilchenkonzentration infolge des hohen Gehaltes an den gemeinsamen Säureionen aufzufassen sei, ähnlich wie Kochsalz durch überschüssige Salzsäure zur Abscheidung aus der Lösung gebracht werden kann. Die mit der Säurekoagulation verbundene irreversible Eiweißveränderung würde hingegen einen sekundären Vorgang darstellen, der sich an die „Aussalzung" anschließt. Zur Prüfung dieser Annahme war deshalb vorerst die Reihenfolge festzustellen, in welcher die verschiedenen Säuren bei steigendem Zusatz auf die Hydratation des Eiweißsalzes wirken, wozu verschiedene Wege eingeschlagen wurden.

Daß zum Unterschiede von den Laugen die Säuren sich dabei nicht allein nach ihrer Stärke ordnen, sondern die Natur des Anions mitspielt, war schon von Pauli und Handovsky[1]) mittels Viscosimetrie festgestellt worden. Diese Versuche brauchten nur im einzelnen ergänzt zu werden. Gerade der Umstand, daß die Säuren in einer spezifischen Reihenfolge auf die an der inneren Reibung erkennbare Eiweißhydratation einwirken, während die Laugen sich lediglich nach ihrer Stärke ordnen, erschien einer Beweisführung günstig, weil diese Reihenfolge auch bei der Eiweißfällung hervortreten mußte. Man durfte im Sinne der obigen Fällungstheorie erwarten, daß eine um so größere Konzentration des gemeinsamen Säureanions, die im hohen Säureüberschuß praktisch mit der Säuredissoziation oder der Konzentration an freien Wasserstoffionen parallel geht, zur Eiweißfällung nötig ist, je stärker das Eiweißsalz hydratisiert bzw. ionisiert ist. Säuren, die beträchtlichere Reibungswerte in gleich starken höheren Säurekonzentrationen zeigen, mußten auch

[1]) Diese Zeitschr. 18, 342. 1909.

Digitized by Google

einen höheren Schwellenwert der Säurefällung ergeben und umgekehrt.

Als zweiter gangbarer Weg, die Hydratation durch verschiedene Säuren zu messen, erwies sich die Bestimmung des Quellungsgrades von Glutin, der in niedrigen Säurekonzentrationen durch ein Maximum geht und mit steigendem Säuregehalt in verschiedenen Säuren verschieden stark abfällt. Hier ist ein allgemeiner Parallelismus im Verhalten der Salze von Säuren des Albumins mit denen des Glutins vorausgesetzt, was auch in Wirklichkeit zutrifft.

Die folgende Tabelle (Tabelle I) enthält die eben flockende Säurekonzentration für Serumalbumin, die Reibungswerte in der (nichtfällenden) Konzentration 0,05 n-Säure, die Quellung von Glutin in 0,05 n-Säure und die zu den Säurekonzentrationen gehörende Konzentration der freien Wasserstoffionen. Alle Einzelheiten sind im experimentellen Teil ausgeführt, es sei hier daraus nur noch hervorgehoben, daß entsprechend der mit der sinkenden Temperatur meist abnehmenden Löslichkeit vorherzusehen war, daß Abkühlung an der Fällungsgrenze die Fällung begünstigen werde, was sich z. B. sehr schön bei der Monochloressigsäure demonstrieren ließ.

Wenn man bedenkt, daß vor allem für die gut stimmenden drei ersten Säuren der Reihe die flockenden Konzentrationen nahe genug an den Konzentrationen liegen, in welchen Quellungs- und Reibungsrückgang bestimmt wurden, und andererseits die geringen Abweichungen in den anderen Fällen bei dem weiten Abstande der flockenden Konzentration unschwer verständlich sind, so dürfen wir aus diesen Versuchen mit großer Wahrscheinlichkeit entnehmen, daß in der Tat der Hydratations- und Ionisationszustand des betreffenden Eiweißsalzes seine Fällbarkeit im Säureüberschuß bedingt, und daß nichts im Wege steht, diese Fällbarkeit primär als eine Verdrängung eines Salzes aus seiner Lösung durch den Überschuß seiner Säure zu betrachten.

Nach unseren Vorstellungen von der Art der Salzbildung zwischen Alkali und Eiweiß war zu erwarten, daß auch hier ähnliche Verhältnisse vorliegen könnten; allerdings mußte hier nicht die Natur der Lauge, sondern nur ihre Stärke für die Ionisationszurückdrängung und Dehydratation im Laugenüberschuß maßgebend sein. Die Erscheinung war deshalb nur bei starken Laugen zu erwarten. Auch diese Erwartung fand sich an unserem reinen

Digitized by Google

Serumeiweiß für Alkalihydroxyde sehr hoher Konzentration (über 5 n) erfüllt, welche eine massige Eiweißfällung geben. Schwache Basen, wie Piperidin und Methylamin, gaben nur in den höchsten Konzentrationen bei Schichtung zarte Trübungen. Der Flockung durch Alkalien folgt später Lösung und Abbau des

Tabelle I.

Fällungs- und Viscositätsversuche an Rinderserumeiweiß A, erstere bei Zimmertemperatur, letztere bei 25° C im Thermostaten, Quellungsversuche an salzfreier 4,57 proz. Gelatine (von 1 g trockener Gelatine aufgenommene Wassermenge bei Quellung in destilliertem Wasser = 0,07 g) bei Zimmertemperatur. Gesamtvolumen in den Fällungsversuchen 10 ccm, RSA-Menge = 2 ccm, Gesamtvolumen der Viscositätsbestimmungen = 10 ccm, RSA = 5 ccm.

Eben flockende Säurekonzentration

nach steigender C_H [1]		nach steigender Normalität	
$CCl_3 \cdot COOH$	0,036 n	$CCl_3 \cdot COOH$ . . .	0,04 n
$CCl_2 \cdot H \cdot COOH$ . .	0,098 n	$CCl_2 \cdot H \cdot COOH$ . .	0,1 n
H_2SO_4	0,116 n	H_2SO_4	0,2 n
$CH_3 \cdot COOH$ . . .	0,141 n	HNO_3	0,2 n
HNO_3	0,181 n	HCl	0,4 n
HCl	0,352 n	$CClH_2 \cdot COOH$ . .	1,5 n
$CCl \cdot H_2 \cdot COOH$ . .	0,411 n	$CH_3 \cdot COOH$ . . .	11,2 n

Säuren geordnet

nach zunehmendem Reibungswert η [2]		nach zunehmender Menge des von 1 g trockener Gelatine aufgenommenen H_2O	
Säurekonzentration = 0,05 n			g
$CCl_3 \cdot COOH$. . . .	1,0603 [3])	H_2SO_4	16,78
H_2SO_4	1,0656 [3])	$CCl_3 \cdot COOH$ . . .	21,09
[$CH_3 \cdot COOH$ . . .	1,0906 [4])]	HCl	22,61
$CCl_2 \cdot H \cdot COOH$ . .	1,1217	$CH_2 \cdot Cl \cdot COOH$ . .	24,29
HCl	1,14	$CH \cdot Cl_2 \cdot COOH$ . .	60,02
$CH_2 \cdot Cl \cdot COOH$ . .	1,3529	$CH_3 \cdot COOH$ . . .	61,42

[1]) Berechnet aus $\alpha = \frac{-kv + \sqrt{4kv + k^2v^2}}{2}$.

[2]) $\frac{t}{t_0} = 1{,}097$ (Serumwert).

[3]) Aus Pauli und Handovsky, Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide. VIII. Diese Zeitschr. 18, 342. 1909.

[4]) Der Reibungswert der Essigsäure kann sich nicht in die Reihenfolge der Fällungswerte ordnen, da die Säure in 0,05 n-Konzentration überhaupt zu schwach ist, um die Ionisation des Eiweißsalzes merklich zurückzudrängen (vgl. bezüglich Essigsäurebindung an Eiweiß Pauli und Hirschfeld, diese Zeitschr. 62, 245. 1914).

Digitized by Google

Eiweißes. Wir stehen nicht an, auch hier den primären Vorgang als eine Überschreitung des Löslichkeitsproduktes $Alb^- \cdot Me^+$ durch die hohe Konzentration des gemeinsamen Metallions anzusprechen. Unsere Versuche und Anschauungen beziehen sich zunächst auf den ersten Abschnitt des Prozesses der Säurekoagulation, und es würde Sache weiterer Spezialuntersuchungen sein, die sekundären Vorgänge der Säuredenaturierung des Eiweißes aufzudecken. Diese würden es auch bedingen, daß das im Säureüberschuß abgeschiedene Eiweißsalz bei einfacher Verdünnung meist nicht wieder in Lösung geht, was bei der frischen Fällung durch starke Laugen glatt der Fall ist.

II. Experimenteller Teil.

1. Fällungsversuche.

Die Versuche wurden zum größten Teil mit Rinderserum (RS), das 5 Wochen in destilliertem Wasser dialysiert war, gemacht. Es wurden 2 Sera verwendet: RSA mit 0,448% Gesamtstickstoff, das entspricht 2,7955% Eiweiß, und RSB, 52 Tage gegen destilliertes Wasser bei Zimmertemperatur und 10 Tage gegen destilliertes Wasser von 35° C dialysiert mit 0,3325% Gesamtstickstoff, d. i. 2,0748% Eiweiß.

Das Rinderserum wurde immer erst am Schluß zugesetzt; wenn nichts Besonderes angegeben ist, wurden die Flüssigkeiten durch kräftiges Schütteln gemischt, in einigen Fällen wurde mit dem Serum überschichtet. Die Resultate wurden meist nach 24 Stunden protokolliert. Das Gesamtvolumen betrug immer 10 ccm. Die Rinderserummenge meist 2 ccm, in einzelnen, besonders erwähnten Fällen, auch 4 ccm. Die Ablesung der Versuchsresultate und ihre Protokollierung erfolgten nach der folgenden Zeichenerklärung:

—	unverändert
$\overline{+}$	zarteste Opalescenz
$\pm$	deutliche Opalescenz
+	zarte Trübung
$\pm$+	milchig durchscheinend
++	milchig opak
$\pm$++	feinste Flockenbildung in trüber Flüssigkeit
$\pm$+++	grobe Flockung in trüber Flüssigkeit
+++	Flockung neben klarer Flüssigkeit.

Digitized by Google

Tabelle II.

Fällungsversuche mit RSA. 10 ccm Gesamtvolum. 2 ccm RSA.

n-Säurekonzentration	Zimmertemperatur 18° C						bei 36° C						bei 3°—4° C					
	$CCl_3 \cdot COOH$	$CCl_2H \cdot COOH$	$CClH_2 \cdot COOH$	$CH_3 \cdot COOH$	HNO_3	HCl	$CCl_3 \cdot COOH$	$CCl_2H \cdot COOH$	$CClH_2 \cdot COOH$	$CH_3 \cdot COOH$	HNO_3	HCl	$CCl_3 \cdot COOH$	$CCl_2H \cdot COOH$	$CClH_2 \cdot COOH$	$CH_3 \cdot COOH$	HNO_3	HCl
0,01																		
0,02																		
0,03																		
0,04																		
0,05																		
0,1																		
0,2																		
0,3																		
0,4																		
0,5																		
0,6																		
0,7																		
0,8																		
1																		
1,5																		
2																		
2,5																		
3																		
3,5																		
4																		

klar — fast klar

Maximum der Fällung — Abn. d. Niederschlags

Weitere Versuche mit Essigsäure ergaben erst bei 11,2n und Verwendung von Eisessig ±.
Versuche mit Oxalsäure und konzentrierter Milchsäure blieben negativ.

Digitized by Google

2. Viscositätsbestimmungen.

Die Viscositätsbestimmungen wurden nach der bekannten Methode im Ostwaldschen Thermostaten und Viscosimeter bei 25° C ausgeführt. Auf 10 ccm Gesamtvolumen entfielen bei Herstellung der Lösung 5 ccm Rinderserum. Die angegebenen Elektrolytkonzentrationen zeigen den Gehalt der fertigen Mischungen an.

3. Quellungsversuche.

Dieselben wurden an einer extrem, meistens mehrere Wochen gegen fließendes destilliertes Wasser dialysierten Gelatine (käufliche Handelsgelatine von guter Qualität) unter Toluolabschluß angestellt. Der Prozentgehalt der Gelatine ist am Kopf der Tabelle hervorgehoben. Diese Gelatine wurde vorsichtig bis zum Schmelzpunkt erwärmt, in Petrischalen ausgegossen, und dann wurden aus der Gelatine mit einem Korkbohrer Scheibchen herausgestanzt; diese kamen auf 24 Stunden in ein mit der betreffenden Lösung beschicktes Pulverglas, nachdem sie vorher auf der analytischen Wage gewogen waren. Nach 24stündiger

Tabelle III.

Fällungsversuche bei Zimmertemperatur an der Fällungsgrenze und in einigen nahegelegenen Konzentrationen. Gesamtvolum 10 ccm RSA, Menge desselben = 4 ccm (doppelte Eiweißkonzentration wie in Tab. II).

Normalität	HCl	H_2SO_4	$CCl_3 \cdot COOH$	$CCl_2 \cdot H \cdot COOH$	$CCl \cdot H_2 \cdot COOH$	$CH_3 \cdot COOH$	HNO_3
0,03 n			±				
0,04 n			±				
0,05 n		−	±	±			−
0,1 n		−		±			−
0,2 n	−	±		++			+
0,3 n	∓	±					++
0,4 n	±						
0,5 n	+						
0,8 n					−		
1,0 n					±		
1,5 n					±		
2,0 n					±		
8,4 n						−	

Digitized by Google

Quellung wurden die Scheibchen zwischen Filtrierpapier rasch vom anhaftenden Wasser befreit und neuerdings zur Wägung gebracht. Die Zahlen in der Tabelle beziehen sich auf die von 1 g trockener Gelatine aufgenommenen Wassermengen in Grammen. Der Quellungswert in destilliertem Wasser ist am Kopfe der Tabelle angegeben.

Tabelle IV.

Versuche mit KOH, bei Zimmertemperatur aufgestellt und dann 24 Stunden bei zirka 0° C im Fenster stehengelassen. Gesamtvolumen 10 ccm, Eiweißkonzentration = 2 ccm RSA.

Normalität	nach 5 Minuten	nach 24 Stunden
1,33 n	−	±
2,66 n	−	−
3,99 n	−	−
5,32 n	−	−
6,65 n	+	++
7,98 n	++	+++
9,31 n	++	+++
10,64 n	++	+++

Tabelle V.

Versuche mit KOH und nahezu globulinfreiem RSB. Versuchsbedingungen wie in Tab. IV.

Normalität	nach 5 Minuten	nach 24 Stunden
1,33 n	−	±
2,6 n	−	−
3,99 n	−	−
5,32 n	++	+++
6,65 n	±±+	+++
7,98 n	±±+	+++
9,31 n	+++	+++
10,64 n	±±+	+++

Tabelle VI.

Versuche mit KOH und RSA. Bei 36° C.

Normalität	nach 5 Minuten	nach 24 Stunden
1,33 n	−	−
2,66 n	−	−
3,99 n	−	−
5,32 n	++	Schwächste Flockenbildung in klarer Flüssigkeit
6,65 n	±+	±++
7,98 n	±±+	±++
9,31 n	±±+	±++
10,64 n	±++	±++

Digitized by Google

Die Laugenfällung ist bei Verdünnung reversibel. Ein Kontrollversuch mit etwas weniger konzentrierter Lauge ergab, daß die Opalescenz in der Anfangskonzentration (1,33 n) nicht etwa auf einem Versuchsfehler beruhte, sondern typisch wiederkehrte, wie auch weitere Versuche ergaben. Die Laugenfällung unterscheidet sich von der Säure-Eiweißfällung dadurch, daß die Flocken mehr den Charakter von Gerinnseln haben und daß diese Gerinnsel nach längerem Stehen immer mehr und mehr im Sinne einer Verdauung verändert werden.

Tabelle VII.

Versuche mit NaOH und RSA, bei Zimmertemperatur aufgestellt und im Fenster bei zirka 0° C stehengelassen.

Normalität	nach 5 Minuten	nach 24 Stunden
1,176 n	—	+
2,352 n	—	·
3,528 n	—	—
4,704 n	—	—
5,880 n	—	—
7,056 n	+ +	+
8,232 n	+ +	+
9,408 n	+ +	+ +

Tabelle VIII.

Eiweißfällung durch organische Basen. RSB. Das Serum wurde dabei mit der Base unterschichtet.

Base	nach 5 Minuten	nach 24 Stunden
Piperidin, konz.	opalescier. Ring	opalescier. Ring
Methylamin 10,75 n (33%) . . .	—	Opalescenz
Trimethylamin, konz.	Gelbfärbung a. d. Grenzschicht	—
Trimethylamin 5,65 n (33%) . .	—	—

Tabelle IX.

Viscositätsbestimmungen an Säureeiweiß bei 25° C. 5 ccm RSA auf 10 ccm Gesamtvolumen. Serumwert $\frac{t}{t_0} = 1{,}097$.

Säurekonzentration	Salzsäure	Monochloressigsäure	Dichloressigsäure	Trichloressigsäure	Schwefelsäure
0,005 n	1 2907				
0,01 n	1,2230	1,1309	1,1130	1,1219	1,1631
0,015 n	1,1769				
0,02 n	1,1523	1,2117	1,1753	1,1372	1,1433
0,03 n	1,1384	1,2779	1,1522	1,1113	1,1357
0,04 n	1,1292	1,3308	1,1304	1,1280	1,1814
0,05 n	1,1400	1,3529	1,1217	1,1616	1,1966

Digitized by Google

Tabelle X. (Abb. 1.)

Quellungsversuche mit 4,57 proz. Gelatine (18 Tage gegen fließendes destilliertes Wasser dialysiert) in einigen Säuren. Die Zahlen sind die von 1 g trockener Gelatine aufgenommenen Wassermengen in Grammen. Der Quellungswert in destilliertem Wasser beträgt 0,07 g.

Säuren	0,005 n	0,01 n	0,02 n	0,03 n	0,05 n
HCl	74,05	50,0	44,92	26,96	22,61
H_2SO_4	34,06	25,8	22,44	15,68	16,78
$CH_3 \cdot COOH$ . . .	36,38	38,83	62,68	52,02	61,42
$CH_2Cl \cdot COOH$ . .	85,17	77,50	74,72	56,84	24,29
$CHCl_2 \cdot COOH$ . .	78,24	58,49	49,99	32,49	60,02
$CCl_3 \cdot COOH$. . . .	85,07	52,78	46,67	28,58	21,09

Diese Resultate sind in Abb. 1 graphisch dargestellt.

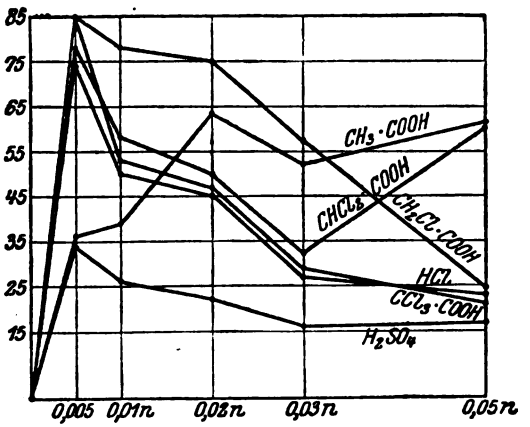


Abb. 1.

Digitized by Google

Beitrag zur Kenntnis des toxischen Einflusses der Terpene auf die höheren Pflanzen.

Von

Antonín Němec und **František Straňák.**

(Aus der staatl. Versuchsanstalt für Pflanzenproduktion in Prag.)

(Eingegangen am 10. Januar 1920.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

Die Terpene sind allgemein verbreitete Pflanzenprodukte, welche den Hauptbestandteil der Sekrete der Pflanzenzellen bilden. Durch eine ergiebige Sekretion zeichnen sich besonders die Gymnospermae (die Nadelhölzer) sowie auch einige aus der Gruppe der Angiospermae. Die Nadelbäume enthalten Terpene nicht nur in den Nadeln, sondern auch im Holz und in der Rinde der Wurzeln und der Stämme. Die Terpene neben ihrer Oxydationsprodukte — Harze — sind die markantesten Bestandteile, welche den eigentümlichen Charakter des Waldbodens verursachen. Der bekannte Forscher Wallach sprach die Vermutung aus, daß die auffallend geringe Vegetation in den Nadelwäldern vielleicht zum Teil auf die Giftwirkung der ätherischen Öle zurückzuführen wäre, welche durch die abfallenden Nadeln usw. in den Boden gelangen und auch in der Luft der Nadelwälder verbreitet werden. Die forstwirtschaftliche Praxis zeigt uns, daß unter Buchen der Boden in gutem, tätigen Zustand bleibt, so daß die Sämlinge der Waldbäume dort gut gedeihen und der natürlichen Verjüngung des Waldes kein Hindernis im Wege steht, während im Nadelwalde durch Zersetzung der Nadelstreu eine Bodenart entsteht, in der die Pflanzen schlecht gedeihen und sogar die Sämlinge der Fichte gewöhnlich bald wieder durch Vertrocknen zugrunde gehen[1]).

[1]) Koch, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. (2), **41**, 545. 1914.

Digitized by Google

Wir können oft die toxische Wirkung der Terpene an den Rasen, die für die Winterzeit mit Reisig bedeckt werden, beobachten: nach Wegnahme desselben zeichnen sich die mit Nadeln bedeckten Stellen des Rasens durch rostig gelbe Färbung aus.

Die toxische Wirkung der Dämpfe verschiedener ätherischer Öle resp. ihrer Bestandteile auf den Pflanzenorganismus ist schon seit Beginn des vorigen Jahrhunderts bekannt.

De Candolle[1]) beobachtete, daß durch Einfluß der Terpentin- und Bittermandelöldämpfe auf grüne Pflanzen an den Blättern braune Flecke entstehen und daß die Pflanze allmählich abstirbt. Ähnliche Versuche sind auch von Schübler[2]) mit Pfefferminzöl und Campher, von Nobbe und Hänlein[3]) mit Lavendelöl ausgeführt worden. Heller[4]) wählte zu seinem Studium neben Campher und Thymol das Pfefferminz-, Salbei-, Cumarin-, Lavendel-, Eucalyptus-, Senf-, Terpentin- und cyanwasserstofffreies Bittermandelöl. Moltz[5]) studierte den Einfluß der Terpentindämpfe, Kryž[6]) neben der der Campherdämpfe die Wirkung der Menthol- und Thymoldämpfe, Koch (l. c.) beschrieb dann die toxischen Wirkungen des Carvens, Terpentins und des Borneolacetates.

Die toxische Wirkung äußert sich bei den grünen Pflanzen zuerst durch blaßgelbe, später braune Verfärbung der Blätter; bald darauf welkt die Pflanze durch Turgorverlust und stirbt ab. Auf den Blättern treten kleine sauer reagierende Tropfen auf. Auch an den Wurzeln kann man schwere Verletzungen beobachten: sie sind wenig verzweigt, leicht brechlich und haben glänzendes Aussehen, stark verminderte Turgeszenz.

Die Dämpfe ätherischer Öle treten nach Heller (l. c.) durch die Spaltöffnungen in die Intercellularräume und werden infolge verhältnismäßig großer Oberfläche der imbibierten Zellwand schnell absorbiert, durchdringen in Form einer Lösung die Zellhaut und die Hyaloplasmahaut bis zum Protoplasma. Deswegen wirken auch in Form von Dämpfen die ätherischen Öle am intensivsten. Heller stellte fest, daß die Pflanzenzellen tot waren, das Protoplasma war unregelmäßig zusammengezogen und die hellgrüne Farbe des Chlorophylls ging in gelbe über. Der mikrochemische Nachweis des Terpens direkt in der Zelle scheitert, denn es handelt sich da um sehr geringe Mengen.

Was den Charakter der chemischen Veränderungen, die in der Zellhaut und im Protoplasma durch Einwirkung der Terpendämpfe verursacht werden, betrifft, ist heute nichts Bestimmtes bekannt. Die toxische Ein-

---

[1]) De Candolle, Mémoires sur la famille des Ombéllifères, S. 11, 1829 und Physiologie végétale **3**, 1347. 1832.

[2]) Schübler, Flora 1827, S. 753.

[3]) Nobbe und Hänlein, Landw. Versuchsstat. **21**, 437. 1878.

[4]) Heller, Flora **93**, 1. 1904.

[5]) Moltz in Sorauer, Handbuch der Pflanzenkrankheiten, S. 748.

[6]) Kryž, Zeitschr. f. Pflanzenkrankheiten **21**, 199. 1911.

Digitized by Google

wirkung der ätherischen Öle wird einerseits in der Ozonisierung des Luftsauerstoffes erblickt. In ganz opponierender Weise erklärt die toxische Wirkung der Terpene, speziell des Camphers, Kryž (l. c.). Er vermutet, daß durch allmähliche Verdrängung der Luft durch Terpendämpfe ein Sauerstoffmangel entsteht und infolgedessen organische Säuren in den Wurzelsekreten und Blatttropfen erscheinen. Unsere Untersuchungen über die chemischen Veränderungen bei Terpenvergiftung der Pflanzen, die wir weiter ausführen, neigen mehr der ersten Ansicht zu in dem Sinne, daß es sich um einen Oxydationsvorgang handelt.

Trotz vieler Arbeiten, die sich mit dem toxischen Einfluß der Terpene auf den Pflanzenorganismus befaßen, hat kein Forscher die Veränderungen in der histologischen Struktur der Pflanzen näher studiert. Unsere Untersuchungen haben gerade in dieser Richtung sehr interessante Ergebnisse gezeitigt, welche uns als Ausgangspunkt bei unseren Bemühungen, die Art der chemischen Reaktionen bei der Terpenvergiftung festzustellen, gedient haben.

Wir haben die toxische Wirkung der Terpene einerseits an den grünen Keimpflanzen der Pferdebohne, Mais, gelben Lupine und Erbsen, andererseits auf dieselben etiolierten Pflanzen studiert, bei denen der toxische Einfluß besonders ausdrucksvoll hervortritt und über deren Verhalten gegenüber den Terpendämpfen bisher nichts bekannt war. Das Studium der toxischen Wirkung der Terpene auf etiolierte Pflanzen war desto interessanter, da unter stark schattenden Nadelbäumen oft ein bedeutender Lichtmangel herrscht und die Vegetation des Unterwuchses den Charakter etiolierter Pflanzen annimmt.

Zu unseren Studien wurde aus den Terpenverbindungen der Kohlenwasserstoff Pinen, welcher die überwiegende Terpentinölkomponente der Koniferen bildet, weiter die Alkohole Menthol, Terpineol, Borneol und das Keton Campher gewählt. Die Versuchspflanzen wurden in Wasserkulturen gezogen und der Einwirkung

1. der Terpendämpfe in der Atmoshäre
2. der gesättigten Lösung des Terpens auf das Wurzelsystem in der Nährlösung ausgesetzt.

Die Wasserkulturen wurden in große, 20 Liter fassende Glaszylinder eingelegt, die mit gut eingeschliffenen Deckeln versorgt waren. Bei den Versuchen über die Einwirkung der Dämpfe, wurde die eingewogene Menge des Terpens auf eine

Digitized by Google

Schale neben der Wasserkultur gelegt. Bei den Versuchen über die Einwirkung der Terpene in gesättigter Lösung wurde das Terpen in die Nährlösung eingewogen und in dem Halse des Gefäßes die Pflanze verkittet, so daß die Terpendämpfe nicht in die Atmosphäre des Zylinders gelangen konnten.

Es wurden überall parallele Kontrollversuche mit destil liertem Wasser und mit Nährlösung ohne Terpen in der Atmosphäre und in der Nährlösung ausgeführt.

A. Versuche mit etiolierten Pflanzen.

Die toxischen Wirkungen der Terpendämpfe bei den etiolierten Keimpflanzen, z. B. Vicia Faba, Phaseolus, Lupinus Luteus, äußern sich makroskopisch zuerst durch Auftreten schwarzer Flecken auf den Blättern, später durch intensives Schwarzwerden derselben; kurz darauf tritt eine graue und schwarze Färbung des Stengels auf, und zwar des unmittelbar unter den Blättern sich befindenden Teiles, hauptsächlich auf dem Epikotyl unter der Nutationskrümmung des Vegetationsgipfels. Dieses Schwarzwerden erscheint bei den Kulturen in reinem destillierten Wasser früher als bei den Pflanzen, die in der Knop schen Nährlösung gezogen wurden, welch letztere scheinen der toxischen Wirkung mehr Widerstandskraft zu leisten. Die ohne Terpen bei gleichen Bedingungen durchgeführten Kontrollversuche zeigten gleichzeitig nicht die geringste Spur von einer Graufärbung oder desgleichen Veränderungen des Stengels. Bei den Terpenpflanzen scheidet sich später auf dem Stengel ein schleimiges, deutlich sauer reagierendes Sekret aus. Die Pflanze verliert den Turgor, die Schwarzfärbung breitet sich auf die ganze Pflanze aus, welche dann gänzlich zusammenfällt. Auffallend ist die geringe Verzweigung der Wurzel, ihr schleimiges Aussehen und ihre Sprödigkeit.

Ähnliches Schwarzwerden des Epikotyls bei den bloß in destilliertem Wasser kultivierten etiolierten Pflanzen von Vicia Faba beschreibt Portheim[1]) und erklärt diese Erscheinung durch Kalkmangel in der Nährlösung. Die von Portheim beschriebene Erscheinung äußert sich bei Vicia Faba durch eine Bräunung und Suspension des Wurzelwachstumes, später durch Auftreten eines

[1]) Portheim, Sitzungsber. d. kais. Akad. d. Wissenschaft, Wien 60, I, 113. 1901.

Digitized by Google

Tropfens auf dem Stengel, welcher auffallend durchsichtig und unter der Nutationskrümmung braun gefärbt ist. Diese Merkmale erschienen bei einer Temperatur von 17—20° C den 9. Tag, bei Phaseolus vulgaris schon nach 3 Tagen. Bei unseren Versuchen beobachteten wir nach 14 Tagen bloß schwache Bräunung des Wurzelsystems, wobei die Gefäßbündel intakt blieben. Die toxischen Wirkungen der Terpendämpfe, welche mit der Portheimschen Beschreibung ziemlich übereinstimmen, stellen sich allerdings auch bei Gegenwart aller Nährstoffe in dem Kultivationsmedium ein und können also nicht durch Mangel an Kalk oder andere Mineralnährstoffe herbeigeführt werden, sondern sie sind eher in einer Störung der biochemischen Prozesse in dem organischen Stoffwechsel der Zelle zu suchen.

Photographie Abb. 1 zeigt die toxische Einwirkung der Terpineoldämpfe (0,05 g Terpineol) nach 48 Stunden auf die etiolierte Pflanze Phaseolus vulgaris.

Einfluß der Terpene auf die histologische Struktur der Pflanzen.

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Versuchspflanzen wurden die histologischen Änderungen im Epikotyl und in der Wurzel festgestellt. Bei dem Epikotyl wurden sowohl der verfärbte Teil, wie auch die äußerlich unveränderten Partien des Stengels oberhalb und unterhalb des attackierten Teiles untersucht.

1. Wirkung der Terpendämpfe in der Atmosphäre.

An dem Querschnitte des gebräunten Teiles des Epikotyls von Vicia faba wurde festgestellt, daß nur gewisse Partien des Zellgewebes durch die Bräunung ergriffen werden. Die Bräunung ist fast ausschließlich auf die Zellhaut und auf gewisse Partien der Gefäßbündel lokalisiert, wo sie hauptsächlich auf den Xylemteil begrenzt ist, wogegen der Phloemteil verhältnismäßig weniger angegriffen ist. Von den übrigen Teilen des Gefäßbündels erscheint die Bräunung auch im Gewebe des Cambialkreises, wo die bezügliche Veränderung die Gerbstoffzellen angreift. Von der Bräunung resp. bis Schwärzung werden alle Gefäßbündel unter der Krümmung und am Epikotyl ergriffen, und zwar intensiver die Peripherstränge als die Zentralstränge. Bei einer längere Zeit dauernder Einwirkung der Terpendämpfe stellt sich die Bräunung ein auch bei den Epidermiszellen sowie auch in den Zellschichten, die knapp unter der Epidermis liegen. Niemals aber erreicht hier die Verfärbung die Intensität der Gefäßbündelverfärbung. Die geschilderten Erscheinungen wurden auch in den Teilen des Stengels, an welchen äußerlich keine Verfärbung zu bemerken war, in den Gefäßbündeln konstatiert.

Digitized by Google

Auf dem Querschnitte der Wurzel wurde beobachtet, daß die Schwärzung in erster Reihe wieder das radiale Gefäßbündel ergreift. Diese Verfärbung ist anfangs auf Xylem und Endodermis begrenzt, die zwischen den Gefäßbündeln und der Rinde eine Grenze bildet, später verbreitet sich auch auf Epiblem und endlich auf die dem Epiblem benachbarte Zellschicht. Auffallend ist die Degeneration der Wurzelhaare, welche sich entweder überhaupt nicht entwickeln oder nur in sehr begrenztem Maße. Auch auf der Wurzelhaube übt die Terpeneinwirkung bestimmte Modifikationen aus: es wird insbesondere das Calyptrogen stärker entwickelt, wodurch der Wurzel ein mächtiger mechanischer Schutz gegen Beschädigung von außen zuteil wird.

Mikrophotographie Abb. 2 zeigt die Einwirkung der Terpendämpfe auf dem Querschnitte des Stengels, Abb. 3 auf dem Querschnitte der Wurzel von Vicia faba. Wir können die Veränderungen an dem Vergleich mit dem Querschnitt des Stengels (Abb. 4) und der Wurzel (Abb. 5) der gesunden etiolierten Pflanze beobachten.

2. Wirkung der Terpene in der Nährlösung unter Ausschluß ihrer Dämpfe aus der Atmosphäre.

In den Zellgeweben des Epikotyls der etiolierten Pflanze konnte keine Veränderung, keine Verfärbung konstatiert werden. Es wurden aber bestimmte Veränderungen in der histologischen Struktur der Wurzelzellgewebe beobachtet, und zwar wieder intensive Bräunung des Xylems im Gefäßbündel, der Endodermis, des Epiblems und des parenchymatischen Gewebes unter der Zellhaut.

B. Versuche mit grünen Pflanzen.

Makroskopisch äußert sich der Einfluß der Terpendämpfe auf grüne Pflanzen z. B. Zea Mays zuerst durch Bildung brauner Flecke, später durch totale Bräunung der Blätter und Bildung sauer reagierender Tropfen. Bei grüner Pflanze der Vicia faba bilden sich zuerst schwarze Flecke, später verfärben sich ganze Blätter schwarz. Die Wurzeln besitzen ein schleimiges Aussehen, sind leicht brechlich, verhältnismäßig wenig verzweigt.

Mikroskopisch wurde auf dem Querschnitte der Versuchspflanze Zea Mays festgestellt, daß die Bräunung das Xylem der Gefäßbündel und die Epidermiszellen eingreift. Nach längerer Einwirkung tritt die Turgorerniedrigung nicht nur im Kreise des Gefäßbündels, sondern auch in den Zellen der übrigen Gewebe ein.

Auf dem Querschnitte durch Stengel der grünen Vicia faba wurde konstatiert, daß im Epikotyl beinahe dieselben Veränderungen eintreten, freilich aber nicht in so intensivem Maße. Die Bräunung bezieht sich zuerst nur auf die Tracheen im Xylem, während andere Gewebe intakt bleiben. Erst nach längerer Einwirkung der Terpendämpfe unterliegen auch diese der Bräunung und der Turgor der Zellen schwindet. Es sei hier bemerkt, daß die Hautschicht und die Chlorophyllkörner unter der Epidermis unberührt bleiben.

Digitized by Google

Was die histologischen Veränderungen in der Wurzel betrifft, wurden dieselben Phänomene wie bei den etiolierten Pflanzen beobachtet, also Verfärbung der Tracheen im Holzteil des Gefäßbündels, der Endodermis sowie auch des Epiblems und einiger Zellenschichten unter der Zellhaut.

Mikrophotographie Abb. 6 bringt den Querschnitt durch das Blatt der grünen Pflanze Zea Mays, in welchem die Gefäßbündel durch Terpeneinwirkung braun verfärbt sind.

Über die chemischen Veränderungen bei der toxischen Wirkung der Terpene auf den Pflanzenorganismus.

Die charakteristische Verfärbung und ihre Lokalisation in bestimmten Geweben der Pflanze, welche durch die Einwirkung der Terpene eintritt und die wir bereits behandelten, führte uns auf den Gedanken, diese Änderungen in der histologischen Struktur zum Studium der biochemischen Prozesse, durch welche diese Verfärbung und die toxische Wirkung herbeigeführt wurde, zu benützen.

Durch mikroskopische und mikrochemische Studien sind wir zu der Ansicht gekommen, daß die tiefbraune Verfärbung der Zellgewebe wahrscheinlich durch chemische Veränderung der Gerbstoffe, welche an bestimmte Orte des Pflanzenorganismus lokalisiert sind, zu erklären ist. Die Gerbstoffe sind in der Regel in Form von Rohrzellen, welche die Gefäßbündel und die Epidermalgewebe begleiten, abgelagert. Diese Gerbstoffschläuche finden wir bei den Leguminosen besonders im Leptom der primären Gefäßbündel des Stengels und der Blätter, bei Phaseolus auch im Mark dicht vor den Gefäßbündeln. Näheres über die Lokalisation der Gerbstoffe bei den Leguminosen finden wir in der Arbeit Baccharinis[1]), welcher in den oberirdischen Organen der Leguminosen zwei Systeme des sog. „apparecchio albuminoso tannico" unterscheidet, das neben der Gerbstoffe stets eine beträchtliche Menge proteinartiger Stoffe enthält. Der erstere derselben, das „extrafasciale", findet sich im Grundgewebe des Blattes und Stengels und besteht im allgemeinen aus gleich gestalteten Elementen wie das umliegende Gewebe. Die Gewebe des anderen Systems, des „parafascialen", sind in Reihen angeordnet, mehr oder weniger langgestreckt und können entweder im Innern des Phloems

[1]) Baccharini Pasquale, Contributo alla conoscenza dell' apparecchio albuminoso tannico delle Leguminose, Malpighia, 6, 255, 325, 536. 1892.

Digitized by Google

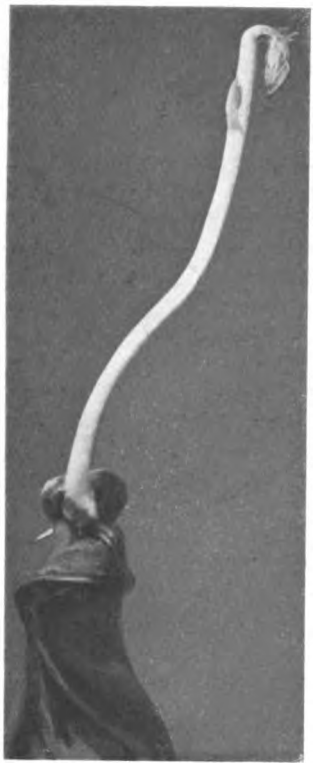


Abb. 1a.

Abb. 1b.

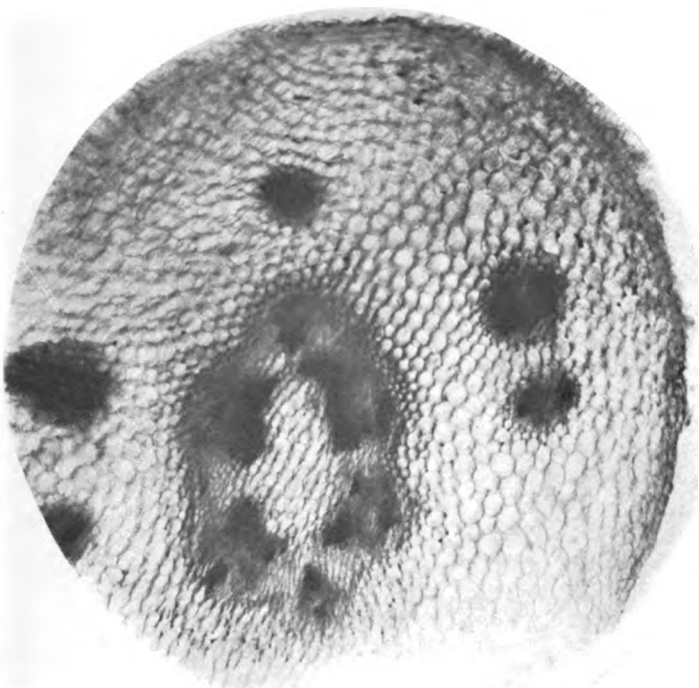


Abb. 2.

Digitized by Google

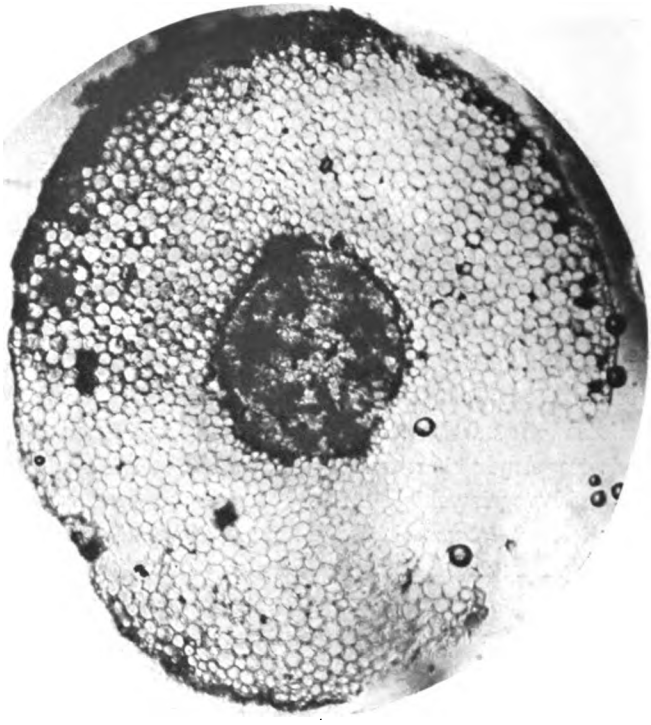


Abb. 3.

Abb. 4.

Digitized by Google

Abb. 5.

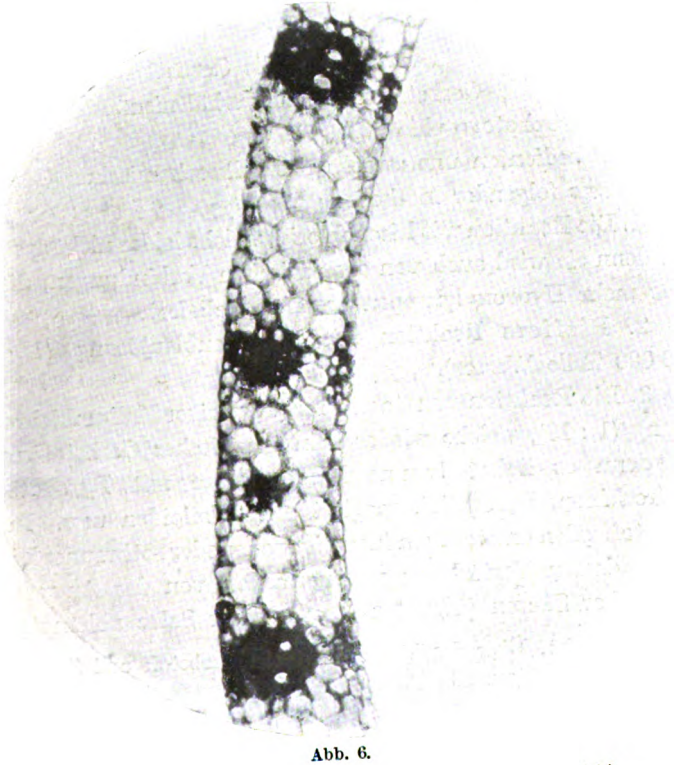


Abb. 6.

Digitized by Google

verlaufen („endofascial") oder an der Peripherie der Gerbstoffbündel („perifascial").

Klenke[1]) studierte die Lokalisation der Gerbstoffe nach der Bertholdschen Methode an den mit konzentrierter Kaliumbichromatlösung injizierten Pflanzen. Er teilt die Gerbstoffe in zwei Hauptgruppen, je nachdem der Gerbstoff diffus, d. h. wesentlich gleichmäßig verteilt in allen Zellen derselben Schicht, oder differenziert, d. h. verschieden verteilt in nächst benachbarten Zellen derselben Schicht, vorhanden ist. Beide Gruppen unterscheiden sich nicht nur durch die Menge der Gerbstoffe, sondern auch durch die Art der Zellgewebe, in denen sie abgelagert sind. Die Gerbstoffe sind lokalisiert in den Epidermisgeweben, besonders in der der Beleuchtung am meisten ausgesetzten Seite des Pflanzenteiles; am Bündel und am Blattrande liegt gewöhnlich ein Gerbstoffmaximum. In den ersten Stadien der Pflanzenentwicklung findet man mehr Gerbstoff als während der späteren Entwicklung.

Unsere mikrochemischen Studien über die Lokalisation der Gerbstoffe haben im allgemeinen diese Ergebnisse bestätigt, bloß konnten wir beobachten, daß in den Holzgeweben (Xylem) der Gefäßbündel (Tracheen) viel mehr Gerbstoff gegenüber dem Phloemteil auftritt, in welchem — die Gerbstoffschläuche ausgenommen — die Gerbstoffmenge unverhältnismäßig kleiner ist (siehe Mikrophotographie Abb. 7).

Wir bedienten uns zwecks des mikrochemischen Gerbstoffnachweises folgender Methoden:

1. Die Reaktion mit Eisenchlorid, welche leider nicht spezifisch ist, denn sie wird auch von aromatischen Verbindungen, die eine oder mehr Hydroxylgruppen besitzen, geliefert.

2. Pfeffers Reaktion mit Methylenblaulösung (1 g auf 500 000 Teile Wasser).

3. Die Reaktion von Sanio mit wässeriger Kaliumbichromatlösung (1 : 10), welche wieder kein spezifisches Gerbstoffreagens ist, denn es liefert braune Niederschläge mit Pyrokatechin, Hydrochinon, Pyrogallol, reagiert mit Alkaloiden usw. In den Gerbstoffzellen entsteht ein intensiv grauer oder rotbrauner Niederschlag, dessen Verfärbung gewissermaßen von der Anwesenheit organischer Säuren (Oxalsäure), oder ihrer Salze abhängt.

[1]) Klenke, Über das Vorkommen von Gerbstoff und Stärke usw. Dissertation Göttingen 83. 1912.

Digitized by Google

Nach Möller ist dieser Niederschlag ein Oxydationsprodukt, und zwar Purpurogallin.

Kuno Peches[1]) mikrochemische Methoden zum Gerbstoffnachweis mittels Formalin und Kaliumhydroxyd führte bei unseren Studien nicht zum Ziel, da diese Reaktion nur durch die eisengrünenden Gerbstoffe geliefert wird.

Abb. 7.

Vergleichen wir die Lokalisation der Gerbstoffe auf dem Querschnitte des Stengels von Vicia Faba nach der mikrochemischen Reaktion von Sanio (Mikrophot. Abb. 7) mit den Erscheinungen, die durch toxische Einwirkung der Terpene auf dieselbe Pflanze entstehen (Mikrophot. Abb. 2), so können wir eine auffallende Übereinstimmung beobachten. Auf Grund dieser Ergebnisse sind wir zu der Ansicht gekommen, daß durch Einwirkung der Terpendämpfe die Gerbstoffe des Pflanzenorganismus verändert

[1]) K. Peche, Ber. bot. Ges. **31**, 463. 1913.

Digitized by Google

werden. Es handelt sich wahrscheinlich um ihre Oxydation in dunkelbraune Produkte bisher unbekannter Konstitution, die wir als Huminstoffe bezeichnen.

Die Oxydationsveränderungen der Gerbstoffe durch Einfluß der Terpendämpfe sind aber keineswegs so einfache Prozesse, wie es auf den ersten Blick scheinen möchte. Prüfen wir die Oxydation der Gerbstoffe durch Terpene in vitro, so sehen wir, daß sich die Reaktion nicht einstellt. Es fehlt noch ein Faktor — und das sind wahrscheinlich die Oxydationsfermente (Peroxydasen) des Pflanzenkörpers.

Ähnliche Oxydationsveränderungen der Gerbstoffe des Pflanzengewebes hat schon Peglion[1]) beobachtet, und zwar an den Kastanienfrüchten: durch Einwirkung der Enzyme, welche der Pilz Rhacodium cellare produziert, werden die Gerbstoffe der Kastanienfrüchte oxydiert, was sich in der Schwarzfärbung der Gewebe, besonders der Cotyledonen äußert. Die Kohlenhydrate und die Stärke erscheint unverändert und dient dem Pilze als Energiematerial. Die Oxydase dieses Pilzes gibt die Guajacolreaktion.

Solche peroxydiastatische Oxydationsveränderungen können auch durch Einwirkung der Terpene verursacht werden. Es ist ja bekannt, daß anstatt des Wasserstoffperoxydes bei Blutnachweis mit Guajacharz man nach Carlson[2]) und Schumm[3]) auch das Terpentin verwenden kann. Man kann also schließen, daß durch Einwirkung der Terpendämpfe auf Pflanzenorganismus die Gerbstoffe bzw. ihre Abbauprodukte durch pflanzliche Peroxydasen in hochmolekulare, farbige Huminstoffe oxydiert werden, wobei das Terpen die Rolle des Wasserstoffperoxydes spielt.

Es wäre vielleicht interessant, noch zu bemerken, daß Raciborski[4]) und Grün[5]) die Anwesenheit der Oxydasen mit Hilfe der Guajacreaktion besonders in der Wand der Gefäße feststellen konnten.

[1]) V. Peglion, Intorno ad un caso di emiparasitimo del Rhacodium cellare. Acc. Lincei **14**, II., 740. 1905.

[2]) C. Carlson, Zeitschr. f. physiol. Chemie **48**, 69. 1906.

[3]) Schumm, Zeitschr. f. physiol. Chemie **50**, 374. 1906.

[4]) Raciborski, Ber. deutsch. bot. Ges. **16**, 119. 1898.

[5]) Grün, Beitr. z. Enzymol. Festschrift f. Schwendener. Berlin 1899, S. 184.

Digitized by Google

Wir sind mit näherem experimentalen Studium dieser Enzymreaktionen beschäftigt und werden über die Resultate unserer Untersuchungen berichten.

Die Ursache höherer Empfindlichkeit etiolierter Pflanzen gegenüber Terpendämpfen im Vergleiche mit grünen Pflanzen kann man im ganzen Charakter der biochemischen Veränderungen, welche im Pflanzenorganismus unter Eliminierung des Sonnenlichtes verlaufen, erblicken. Unter diesen Bedingungen überwiegen die Prozesse der regressiven Stoffmetamorphose, und die durch Abbau entstandenen Produkte weisen mehr freie reaktive Gruppen auf, welche eher in chemische Reaktionen eintreten können als die komplizierten Stoffe der grünen Pflanzen, bei denen die reaktiven Gruppen untereinander gebunden sind.

Zusammenfassung.

1. Durch toxische Einwirkung der Terpendämpfe auf den Pflanzenorganismus entstehen charakteristische Veränderungen in der histologischen Struktur der beschädigten Pflanzen. Bestimmte Partien des Zellgewebes werden durch Bräunung bei grünen, durch Schwärzung bei etiolierten Pflanzen ergriffen, welche Verfärbung bei dem Stengel auf die Gefäßbündel, und zwar auf die Tracheen des Xylemteiles beschränkt ist. Bei der Wurzel ist die Verfärbung anfangs auf den Xylemteil der Gefäße und auf die Endodermis beschränkt, später verbreitet sie sich auch auf das Epiblem. Die Epidermis sowohl des Stengels wie der Wurzel ist ebenfalls verfärbt.

2. Bei etiolierten Pflanzen stellt sich weit intensivere Verfärbung ein, welche einen bis schwarzen Ton erreicht, während bei grünen Pflanzen die Verfärbung eher ins Braune geht.

3. Was den Charakter der chemischen Veränderungen bei der toxischen Einwirkung der Terpendämpfe anbelangt, sind wir der Ansicht, daß es sich um eine biochemische Oxydation der Gerbstoffe in farbige Produkte, sogenannte Huminstoffe handelt, welche unter Mitwirkung der Peroxydasen des Pflanzenkörpers verläuft, wobei die Terpene eine ähnliche Rolle wie das Wasserstoffperoxyd oder Terpentin bei Blutnachweis mit Guajak spielen.

Digitized by Google

Das optische Drehungsvermögen der Dextrose unter dem Einfluß von Salz- und Schwefelsäure.

I. Mitteilung.

Von

Hans Murschhauser.

(Aus der akademischen Klinik für Kinderheilkunde in Düsseldorf.)

(Eingegangen am 19. Januar 1920.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Vor einiger Zeit hatte ich beobachtet, daß beim Kochen von Dextroselösungen mit den Carbonaten der alkalischen Erden eine teilweise Umwandlung von Dextrose in Lävulose stattfindet. Das Ergebnis meiner Untersuchungen veranlaßte mich, die unter verschiedenen Bedingungen jeweils gebildete Lävulose quantitativ zu ermitteln. Ich hatte dabei an eine Bestimmungsmöglichkeit beider Zuckerarten auf optischem Wege gedacht unter Heranziehung der bekannten, der Lävulose eigenen Empfindlichkeit gegen Salzsäure. Ein Erfolg war nur dann zu erwarten, wenn sich Bedingungen ermitteln ließen, unter denen einerseits die Zerstörung der Lävulose eine quantitative war, und andererseits das Drehungsvermögen der Dextrose durch die Salzsäure nicht oder in gesetzmäßiger Weise verändert würde. Die Versuche mußten auf breiter Basis angelegt werden; das galt vor allem bezüglich der Salzsäurekonzentration, der Temperatur und der Einwirkungsdauer. Ehe die Verhältnisse festgelegt werden sollten, unter denen die vollständige Zerstörung der Lävulose erfolgte, suchte ich mir die nötige Kenntnis über die Beeinflussung der Drehung der Dextrose durch Salzsäure zu verschaffen.

Als ich zu diesem Zwecke im Vorversuch Dextrose in 10proz. kalter Salzsäure löste und dann polarisierte, bemerkte ich, daß die Mutarotationserscheinung innerhalb der zum Lösen benötigten

Digitized by Google

Zeit durch die Salzsäure aufgehoben war und eine spezifische Drehung resultierte, deren Wert etwas höher lag als der einer wässerigen Lösung. Aus der erstgenannten Erscheinung leitete ich die Folgerung ab, daß Salzsäure geringerer Konzentrationen die Mutarotation der Dextrose in dem Sinne beeinflussen würde, daß der Reaktionsverlauf in saurer Lösung eine möglicherweise meßbare Beschleunigung erfährt.

Suchen wir nach früheren Angaben über diesen Gegenstand, so finden wir, daß Erdmann[1]) bereits 1855 mitteilte, daß der Rückgang der Birotation durch Zusatz von Säuren beschleunigt würde. Und A. Levy[2]) stellte, indem er Dextrose in Lösungen der verschiedensten Säuren brachte, welche die Säure in äquivalenten Mengen enthielten, fest, daß die Geschwindigkeit des Drehungsrückganges sowohl von der Natur als Konzentration der Säure, bzw. von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung abhänge. Die von ihm gewählten Konzentrationen waren $^1/_{50}$ und $^1/_{10}$ normal. Gleichzeitig, aber völlig unabhängig von Levy hatte E. Trey[3]) den Drehungsrückgang von Dextroselösungen bei Gegenwart der verschiedensten Stoffe bestimmt und dabei für einige Säurekonzentrationen in Versuchen bei $+3{,}0°$ die Geschwindigkeitskonstanten des Mutarotationsverlaufes berechnet. Die Versuche Levys sind hauptsächlich in der Absicht angestellt worden, Beziehungen zwischen der Geschwindigkeit des Drehungsrückganges und der Art und Konzentration der Säuren aufzudecken, und das ist ihm denn auch durch Anwendung möglichst verschiedener Säuren in vergleichbaren Mengenverhältnissen gelungen; die Arbeit Treys trägt den Charakter eines Aufklärungsversuches über die für das Phänomen der Mutarotation aufgestellten Hypothesen.

Nach den bisher erwähnten Arbeiten bewirken Säuren eine Beschleunigung des Mutarotationsverlaufs von Dextroselösungen. Demgegenüber zeigten Osaka[4]) und andererseits Hudson[5]), daß geringe Mengen schwacher Säuren (wie Essig- und Bernsteinsäure) den Drehungsrückgang von frisch bereiteten Dextroselösungen verzögern.

Der Einfluß der Salzsäure auf die Drehungsverhältnisse der Dextrose ist in keiner der bestehenden Arbeiten systematisch und für die vorliegende Frage zureichend behandelt worden. In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die Wirkung von Salzsäure verschiedener Konzentration auf die Drehung der Dextrose bei Zimmertemperatur untersucht werden. Vergleichsweise wurden auch die Verhältnisse in Schwefelsäurelösungen studiert. Als

[1]) Diss. de sacch. lact. et amyl. Berol. 1855.
[2]) Zeitschr. f. physikal. Chemie **17**, 301. 1895.
[3]) Zeitschr. f. physikal. Chemie **18**, 193. 1895; **22**, 424. 1897.
[4]) Mem. Coll. Eng. Kyoto **1**, 304. 1908.
[5]) Journ. Americ. chem. Soc. **29**, 1571. 1907.

Digitized by Google

Basis für beide Säuren dienten die Drehungserscheinungen der wässerigen Lösung. Aus dem jeweiligen Drehungsrückgang der wässerigen und sauren Lösungen verschiedenster Konzentration wurde die Geschwindigkeitskonstante für die Mutarotation errechnet.

Experimenteller Teil.

Zu den Versuchen diente ein Dextrosepräparat, das als Traubenzucker puriss. wasserfrei bezeichnet und von E. Merck bezogen war. Es wurde vor Beginn der Versuche durch Polarisation seiner wässerigen Lösung und durch Ermittlung seines Reduktionsvermögens mit Fehlingscher Lösung nach der Modifikation von E. Pflüger untersucht.

Zur Bestimmung des Drehungsvermögens diente ein Halbschattenapparat von Schmidt & Haensch mit Kreisgradteilung und Nonius; das verwendete Polarisationsrohr hatte eine Länge von 189,4 mm; die im folgenden enthaltenen Angaben für die absolute Drehung beziehen sich auf diese Rohrlänge. Die Genauigkeit der Ablesung betrug $^5/_{100}$ Grade bzw. Prozente Dextrose. Es wäre wünschenswert gewesen, Versuche dieser Art mit einem Apparat von höherer Genauigkeit durchzuführen; die Beschaffung eines solchen war gegenwärtig unmöglich. Ein eingehendes Studium von Arbeiten anderer Autoren, denen Apparate mit feinerer Ablesemöglichkeit zur Verfügung gestanden hatten, ließ mich jedoch erkennen, daß auch dort bei Parallelbestimmungen Differenzen von 0,1° und mehr vorkamen; damit schwanden meine Bedenken gegen die Verwendung des mir zur Verfügung stehenden Apparates. Aus Gründen der Sicherheit habe ich aber von all meinen Versuchsserien Doppelbestimmungen völlig unabhängig voneinander ausgeführt und jede Ablesung, soweit das möglich war, zweimal kontrolliert; ich habe dabei nie größere Differenzen als 0,1° erhalten. Der Nullpunkt des Apparates wurde vor, während und am Ende längerer Versuche kontrolliert und stets richtig befunden. Als Beleuchtungsquelle diente das Chlornatriumlicht.

Bei der Bedeutung, welche Wärmeunterschiede für den Verlauf der Mutarotation haben (wir wissen, daß sie durch kurzes Kochen der Lösung völlig aufgehoben wird), wurde auf Einhaltung einer durch alle Versuche hindurchgehenden gleichmäßig hohen Temperatur ein besonderes Augenmerk verwendet. Zur Er-

Digitized by Google

reichung dieses Zieles wurde das Polarisationsrohr mit einem Glasmantel umgeben, dessen zwei diametral einander gegenüberstehende Ansatzrohre den Durchfluß von Wasser bestimmter Temperatur durch dasselbe ermöglichten. Das zur Einhaltung der konstanten Temperatur bestimmte Wasser floß aus einem in erhöhter Stellung angebrachten, größeren Vorratsgefäß zunächst durch eine Flasche mit einem in $^1/_{10}$ Grade eingeteilten Thermometer, von hier durch den Glasmantel des Polarisationsrohres, passierte dann ein zweites Gefäß mit Thermometer und floß dann ab. Die für die vorliegenden Versuche gewählte Temperatur betrug 20,4°; bei den Schwefelsäureversuchen ist sie nicht mit derselben Sorgfalt eingehalten worden als bei den Salzsäureversuchen; deshalb ist auch bei jenen die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten unterblieben. Trotz aller Vorsichtsmaßregeln ließen sich jedoch gelegentlich Temperaturschwankungen bis zu 0,2° nicht vermeiden.

Bei Anstellung der Versuche wurde in einheitlicher Weise und zwar folgendermaßen verfahren:

Je 4,75 g Dextrose wurden auf der analytischen Wage mit einer Genauigkeit von 1 mg in ein 150 ccm fassendes Becherglas abgewogen, vom Lösungsmittel (Wasser oder Säure) zirka 50 ccm zugegeben und unter Verwendung eines stempelartigen Glasstabes mit möglichster Geschwindigkeit gelöst.

Die Lösung wurde in einen genau geeichten 100-ccm-Kolben übergeführt, und unter wiederholtem Nachspülen des Becherglases mit dem Lösungsmittel auf 100 ccm ergänzt.

Nachdem das Ganze gründlich durchgemischt und eine Probe hiervon in die Polarisationsröhre gefüllt worden war, wurde im polarisierten Lichte beobachtet. Der Lösungsprozeß nahm nie längere Zeit als etwa $^1/_2$ Minute in Anspruch. Die Temperatur des Lösungsmittels wurde unter Berücksichtigung der jeweiligen Außentemperatur so gewählt, daß sie unmittelbar nach dem Lösen ca. 20,4° betrug. Die erste Ablesung konnte regelmäßig 5 Minuten nach begonnenem Lösen erfolgen. Als Beginn des Prozesses gilt der Moment, in dem der erste Tropfen Flüssigkeit mit dem Zucker in Berührung kam. Die Ablesungen wurden anfangs alle 5, später in Abständen von 10 oder 20 Minuten wiederholt, je nach der Geschwindigkeit des Rotationsrückganges. 24 und zum Teil mehrmals 24 Stunden nach Beginn des Lösens

Digitized by Google

erfolgten weitere Ablesungen einerseits zur Feststellung der Enddrehung, andererseits zur Auffindung nachträglich auftretender Drehungsänderungen.

In der beschriebenen Weise wurde der Drehungsverlauf von Dextroselösungen in destilliertem Wasser, Salz- und Schwefelsäure wechselnder Konzentration verfolgt. Als niedrigste Säurekonzentration wurde diejenige gewählt, bei welcher eben noch ein Unterschied im Rotationsrückgang gegenüber destilliertem Wasser festzustellen war. Die Konzentration der Säuren wurde titrimetrisch ermittelt; die Gehaltsangaben der verschiedenen Säuren beziehen sich auf Gramme Säure in 100 ccm.

Aus dem beobachteten Drehungswinkel wurde das spezifische Drehungsvermögen nach der Formel $\alpha_D = \frac{\alpha \cdot 100}{c \cdot l}$ berechnet.

Aus den Untersuchungen von Urech wissen wir, daß es sich bei der Mutarotation um eine Reaktion ersten Grades handelt, ebenso wie bei der Inversion des Rohrzuckers durch verdünnte Säuren. Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstante des Reaktionsverlaufs erfolgte unter Zugrundelegung der Wilhelmyschen Formel[1])

$$\log \frac{1}{1 - \frac{x}{b}} = c \cdot t ,$$

deren Zulässigkeit bei der Birotation von Urech[2]) erwiesen worden ist; in der Formel bedeutet b den gesamten durchlaufenen Drehungswinkel, x den Winkel nach der Zeit t, c die Geschwindigkeitskonstante. Diese wiederum, deren Werte die letzte Kolumne der am Schlusse der Arbeit befindlichen Protokolle wiedergibt, errechnet sich nach

$$\frac{\log b - \log (b - x)}{t} = c ,$$

wobei die Zeit der Beobachtung $t - 5$ Minuten genommen wurde. Um Brüche zu vermeiden, sind die Werte für $\log b - \log (b - x)$ mit 1000 multipliziert.

Die Ergebnisse meiner Versuche finden sich am Schlusse der Arbeit. Sie beginnen mit den Beobachtungen an der wässe-

[1]) Poggend. Annal. **81**, 413 u. 499. 1850.
[2]) B. B. **13**, 1696. 1880.

Digitized by Google

rigen Dextroselösung, weil diese als Grundlage für die Säureversuche dienen sollten. In den Tabellen bedeutet t die Anzahl der Minuten, die vom Beginn des Lösens bis zur Ablesung verstrichen sind, T die Temperatur, C die Geschwindigkeitskonstante, ∞ den Endwert nach 24 Stunden. Bei den mittleren Säurekonzentrationen wird die Genauigkeit vermutlich wegen der erhöhten Geschwindigkeit des Reaktionsverlaufs und der dadurch bedingten Beschränkung der Anzahl der Ablesungen geringer; deshalb unterblieb dort auch die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten.

Ergebnis.

Aus den Tabellen am Schlusse der Abhandlung ersehen wir, daß die für frisch bereitete wässerige Lösungen von Dextrose bekannte Erscheinung der Mutarotation auch bei sauren Lösungen bis zu einer gewissen Konzentration existiert.

Verfolgen wir den zeitlichen Verlauf der Mutarotation von Lösungen der Dextrose in Wasser oder Salzsäure einer bestimmten Konzentration und vergleichen die nach bestimmten Zeiten für die Drehung und die Geschwindigkeitskonstanten erhaltenen Zahlen der verschiedenen Versuchsreihen miteinander, so stellen wir fest, daß der Einfluß der Säure auf die Mutarotation der Dextrose in einer Beschleunigung der Reaktion gegenüber destilliertem Wasser besteht, der um so stärker ist, je höher die Konzentration der Säure ansteigt. So sind beispielsweise bei destilliertem Wasser die Werte für die spezifische Drehung nach 5, 10, 30 und 60 Minuten 108,9° bzw. 105,0, 90,04 und 76,14°; diesen Zahlen stehen bei Verwendung von 0,1 proz. Salzsäure nach gleichen Zeiten spezifische Drehungen von 105,6 bzw. 99,78, 80,59 und 65,50° und bei 0,5 proz. Salzsäure solche von 95,6°, 82,2°, 59,5° und 53,91° gegenüber. Als unterste Grenze für die Säure wurde, wie in der Einleitung bereits mitgeteilt wurde, diejenige Konzentration gewählt, bei der eben noch ein Ausschlag gegenüber destilliertem Wasser zu konstatieren war. Diese Grenze liegt bei 0,005 proz. Salzsäure.

Zur rascheren Orientierung habe ich einige nach bestimmten Zeiten erhaltene Werte für die spezifische Drehung bei den verschiedenen Säurekonzentrationen in der kurz gefaßten Tabelle I zusammengestellt.

Digitized by Google

Tabelle I.

α_D-Werte für Traubenzucker in

t	dest. Wasser	und Salzsäure wechselnder Konzentration (g HCl in 100 ccm).								
		0,0051	0,025	0,05	0,102	0,25	0,53	1,03	2,1	3,1 % HCl
5 Min.	106,9	106,4	107,8	106,7	105,6	102,8	95,60	87,81	71,1	68,4
15 „	101,0	99,49	98,98	96,71	98,9	85,57	78,90	62,75	54,5	53,3
30 „	90,04	91,17	87,82	85,57	80,49	70,58	59,5	53,80	—	—
60 „	76,14	75,03	72,87	70,58	65,50	57,8	53,9	—	—	—
1 Tag	52,8	52,8	52,8	52,8	52,8	52,8	52,8	52,8	53,3	53,3
2 Tage										
3 „										
6 „										
	3,62	4,18	5,10	5,98	7,04	8,00	10,0	20,17	29,8	46 % HCl
5 Min.	61,7	58,40	55,6	55,60	53,90	53,90	55,0	56,7	60,02	74,5
15 „	53,3	53,3	53,3	—	—	—	—	56,7	60,02	75,6
30 „	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
60 „	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 Tag	—	53,3	53,3	53,3	53,90	53,90	54,50	57,8	61,1	77,8
2 Tage										
3 „							54,5	57,8	61,1	77,8
6 „			53,3				54,5	57,8	62,2	76,7
11 „			53,3				54,5	—	62,2	73,4
21 „							54,5	57,8	63,4	64,5
37 „							54,5	58,9	—	62,2

Weit anschaulicher als in der Tabelle tritt uns der Verlauf des Drehungsrückganges in der Kurventafel I entgegen. Jede einzelne Kurve der Tafel stellt für sich den Rotationsverlauf einer frisch bereiteten Dextroselösung dar, sei es in destilliertem Wasser, sei es in Salzsäure einer bestimmten Konzentration. In das Koordinatensystem sind die Zeiten als Abszissen, die diesen entsprechenden absoluten Drehungen als Ordinaten eingetragen.

Wie aus der Tafel ersichtlich, erfolgt der Verlauf der Mutarotation sowohl wässeriger als salzsaurer Dextroselösungen nicht geradlinig, sondern in gekrümmten Kurven, die um so steiler abfallen, und um so kürzer werden, je höher die verwendete Säurekonzentration ist.

Wenn nun der Einfluß der Salzsäure auf die Mutarotation von Dextroselösungen in einer mit der Konzentration zunehmenden Beschleunigung des Drehungsrückganges besteht, so muß derselbe sich schon in den ersten Ablesungen für die verschiedenen Konzentrationen äußern. Es werden also die Anfangswerte (5 Minuten nach begonnenem Lösen) nicht in einem Punkte zusammenfallen, sondern um so tiefer ansetzen, je höher die Konzentration der zum Lösen verwendeten Säure war. Als natürliche Konsequenz dieser Wirkung der Säure auf die Mutarotation erwarten wir, daß bei einer bestimmten Säurekonzentration

Digitized by Google

5 Minuten nach Beginn des Lösens die Mutarotation aufgehoben sein wird und die Drehung eine Konstanz erreicht hat. Dieser Fall liegt bei Verwendung einer ca. 7proz. Salzsäure vor. Von dieser Konzentration ab aufwärts ist aber auch die Mutarotationserscheinung regelmäßig in der zur Lösung der Dextrose benötigten Zeit abgeschlossen und es resultieren Werte für die Drehung, die für längere Zeit oder dauernd konstant bleiben. Aber die Werte, die hierbei erreicht werden, decken sich nicht mit dem der wässerigen Dextroselösung von 4,75, sie liegen vielmehr höher. Die Drehung der Dextrose scheint danach in einem Abhängigkeitsverhältnis vom Lösungsmittel zu stehen. Sie beträgt beispielsweise nach unseren Feststellungen für eine Lösung in 7,04 proz. Salzsäure $\alpha_D^{20,4} = 53{,}91°$. Diese Erhöhung des Endwertes tritt uns aber nicht erst bei 7proz., sondern schon bei 2,1proz. Salzsäure entgegen. Die spezifische Drehung berechnet sich hier zu $\alpha_D = 53{,}30°$. Von dieser Konzentration ab steigen die Werte für die spezifische Drehung der Dextrose mit dem

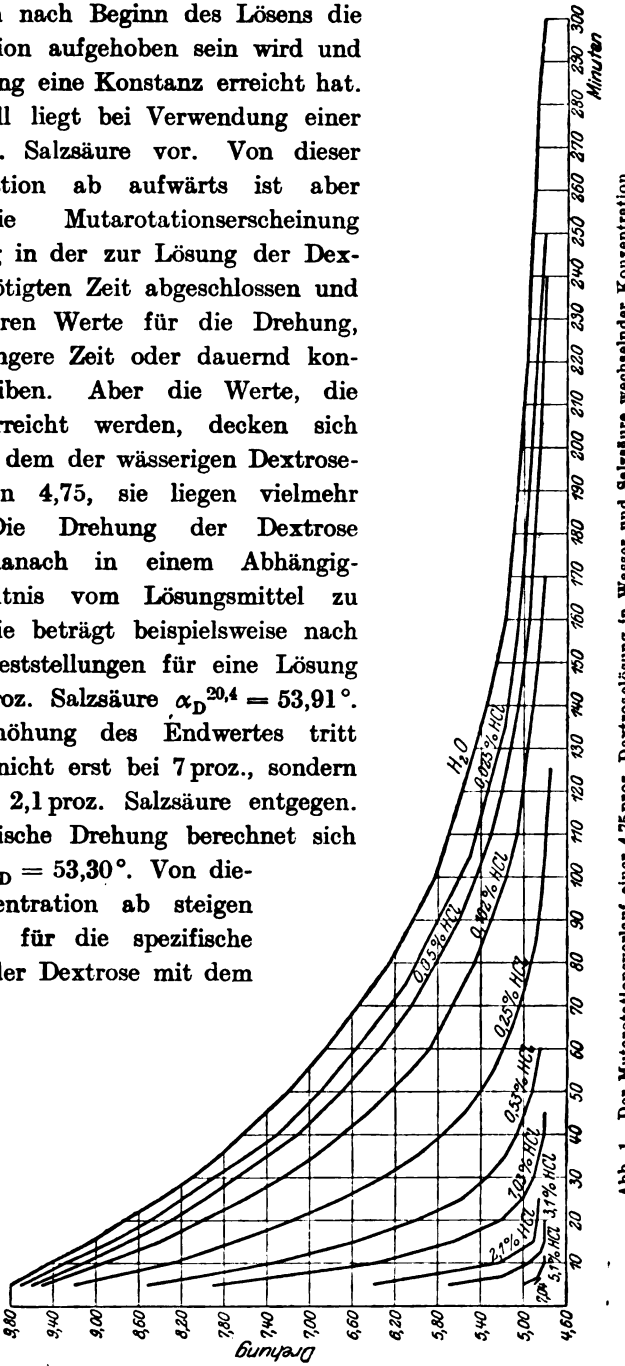


Abb. 1. Der Mutarotationsverlauf einer 4,75proz. Dextroselösung in Wasser und Salzsäure wechselnder Konzentration.

Digitized by Google

Säuregehalt der Lösung an. Bei 46proz. Salzsäure beträgt der Wert für α_D unmittelbar nach dem Lösen 74,5°.

Die Beobachtung, nach der die spezifische Drehung der Dextrose in Salzsäure eine Änderung erfährt, also in einem Abhängigkeitsverhältnis vom Lösungsmittel steht, findet sich bereits in der Literatur. Im Jahre 1913 haben R. Willstätter und Zechmeister[1]) die Erscheinung bei 1proz. Dextroselösungen in Salzsäure höherer Konzentrationen wahrgenommen. Auf die Abhängigkeit der spezifischen Drehung der Dextrose vom Lösungsmittel hat aber bereits 1915 E. Trey hingewiesen; er ermittelte für Dextroselösungen in reinem Äthylalkohol eine spezifische Drehung von 62,42° und in einer Mischung gleicher Volumina Äthylalkohol und Wasser eine solche von 56,68°; auch für Methylalkohol und Mischungen desselben mit Wasser wurden höhere Konstanten für die Drehung eruiert als in destilliertem Wasser.

Ähnlich wie bei der Salzsäure liegen die Mutarotationsverhältnisse bei Verwendung von Schwefelsäure. Tabelle II verschafft uns einen kurzen Überblick.

Tabelle II.

α_D-Werte für Traubenzucker in

	Wasser	Schwefelsäure wechselnder Konzentration (g H_2SO_4 in 100 ccm).									
t		0,105	0,247	0,53	1,05	3,06	5,14	10,17	20,39	30,58	41,19%
5 Min.	108,9	106,2	103,4	97,8	88,4	71,7	61,1	56,7	55,6	54,5	56,1
15 „	101,0	94,5	87,6	80,3	67,8	55,0	53,9	54,1	—	—	—
30 „	90,04	80,3	71,8	63,9	55,8	53,3	—	—	—	—	—
60 „	76,14	64,6	59,2	55,1	—	—	—	—	—	—	—
24 Std.	52,8	52,8	52,8	52,8	52,8	52,8	53,3	53,3	53,3	55,0	55,0
2 Tage						52,8	53,9	53,3	53,3	55,0	55,0
12 „						52,8	53,9	53,3	—	55,0	55,6
29 „						52,8	53,3	54,5	54,5	55,6	56,7

Die den Rotationsrückgang beschleunigende Wirkung derselben ist aber etwas geringer als die der Salzsäure. In Analogie mit den dortigen Erscheinungen sinken die Werte für die spezifische Drehung vom Beginn des Lösens um so rascher, je höher die Säurekonzentration ist. Folglich muß auch hier bei einer bestimmten Säurekonzentration innerhalb der zum Lösen benötigten Zeit von 5 Minuten die Mutarotation ihren Abschluß gefunden haben und ein Endwert erreicht werden, der für längere Zeit konstant bleibt. Dieser Konzentrationsgrad ist hier nicht genau getroffen. Die Untersuchungen wurden nicht weiter fortgesetzt, da sie nicht zum eigentlichen Thema gehörten. In den höheren Säurekonzentrationen stiegen die Werte für die spezifische Drehung mit dem Säuregehalt der Lösungen an, wenn auch in

[1]) B. B. 46, 2401. 1913.

Digitized by Google

viel geringerem Grade als bei der Salzsäure. Die Drehungserscheinungen in den höheren Konzentrationen sind wieder als spezifisch für das Lösungsmittel zu betrachten.

Das Kurvenbild der Tafel I läßt uns erkennen, daß die Mutarotation frisch bereiteter Dextroselösungen vollständig gesetzmäßig verläuft. Aus den Ergebnissen der Versuche von A. Levy[1]) und E. Trey[1]) über den Einfluß der verschiedensten Säuren auf den Mutarotationsverlauf der Dextrose geht hervor, daß derselbe in völliger Analogie mit anderen zeitlich langsam verlaufenden chemischen Vorgängen wie der Zersetzung des Methylacetats und der Inversion des Rohrzuckers durch verdünnte Salzsäure erfolgt, also von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung abhängt. Diese Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Säurekonzentration geht aus einem Vergleich der Werte für die Geschwindigkeitskonstante C in der letzten Kolumne der nachfolgenden Protokolle hervor. So beträgt die Geschwindigkeitskonstante der Mutarotation für die wässerige Lösung 6,72, für die 2,1 proz. Salzsäure im Mittel 101,8; für die Säurekonzentrationen zwischen 0 und 2,1% liegen die C-Werte zwischen den angeführten Zahlen. Die Übereinstimmung der Werte für C war sowohl innerhalb der einzelnen Versuchsreihen als bei Parallelversuchen durchaus befriedigend.

Je höher nun der Wert für die Geschwindigkeitskonstante, desto kürzer wird die Zeitdauer sein, innerhalb der der Mutarotationsrückgang seinen Abschluß gefunden haben wird. Um den Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen anschaulich zu gestalten, habe ich die Werte für die Geschwindigkeitskonstanten des Drehungsrückganges der Dextroselösung in Wasser und Salzsäure der verschiedenen Konzentrationen den zeitlichen Verhältnissen gegenübergestellt. Da eine Durchführung der einzelnen Versuche bis zum Abschluß der Mutarotation nicht erfolgt war, mußte ein beliebiger Punkt innerhalb des ganzen durchlaufenen Winkels als gemeinschaftlicher Endwert aufgestellt werden. Es wurde der Kreisgrad 5,0 gewählt. Die nachfolgende Tabelle enthält nun einerseits die mittlere Geschwindigkeitskonstante C für die verschiedenen Lösungen, und andererseits die Anzahl Minuten, die vom Beginn des Lösens bis zur Erreichung des Kreisgrades 5 verstrichen sind.

[1]) l. c.

Digitized by Google

Tabelle III.

Geschwindigkeitskonstante C des Mutarotationsverlaufes einer 4,75 proz. Dextroselösung in Wasser und Salzsäure wechselnder Konzentration; Dauer des Rotationsrückganges in Minuten vom Beginn des Lösens bis zur Erreichung des Kreisgrades 5,0.

Wasser	Salzsäure						
	0,0051	0,012	0,025	0,05	0,102	0,25	0,53%
$C = 6{,}72$	7,00	7,42	8,02	8,91	11,38	18,12	31,48
Minuten 210	190	187	173	150	115	75	43

1,03	2,1	3,1	3,62	4,18	5,10	5,93	7,04	8,00%
$C =$ 54,45	101,8	166,0	—	—	—	—	—	—
Minuten 25	14	10	7	6	5	5	4	unter 4.

Die Geschwindigkeitskonstante steigt demnach, wie eine graphische Aufzeichnung dieser Zahlen leicht erkennen läßt, geradlinig mit der Säure- und vermutlich der Wasserstoffionenkonzentration an. Daher muß die Zeit, welche zur Umwandlung der gleichen Menge x nötig ist, der Geschwindigkeitskonstante des Katalysators $C_1, C_2 \ldots C_n$ umgekehrt proportional sein; denn es bildet ja der Ausdruck $\log \frac{b}{b-x}$ eine konstante Größe, da wir die Zeiten $t_1 t_2 \ldots t_n$ bis zur Erreichung der gleichen umgesetzten Menge bestimmt haben.

Um das Gesagte an einem konkreten Beispiel zu illustrieren, wollen wir annehmen, daß die umgewandelte Menge $x = 95\%$ des Gesamtwertes betragen soll; in diesem Falle würde der Ausdruck $\log \frac{b}{b-x}$ die Gestalt $\log \frac{100}{100-95} = \log 20$ annehmen. Somit ist log 20 der konstante Wert (Ordinate), den das Produkt irgendeiner beliebigen Geschwindigkeitskonstante C_n mit der zugehörigen Zeit tn ergeben muß. Demnach existiert die Beziehung $C_1 t_1 = C_2 t_2 \ldots C_n t_n = \log 20$. Es sind nämlich, wie beim Boyle-Mariotteschen Gesetz Gas und Druck, hier die Reaktionsgeschwindigkeiten den zugehörigen Zeiten für den gleichen Betrag der Umwandlung umgekehrt proportional.

In Tabelle I ist zahlenmäßig gezeigt worden, daß die Mutarotation von einer bestimmten Salzsäurekonzentration ab innerhalb der vom Beginn des Lösens bis zur 1. Ablesung benötigten Zeit von 5 Minuten aufgehoben ist; die Konzentration betrug

Digitized by Google

ca. 7%. Die dort erzielte Enddrehung entsprach aber einem höheren spezifischen Drehungsvermögen für Dextrose als wässerige Lösungen besitzen. Diese Änderung der Drehung wurde schon für niedrigere Säurekonzentrationen ermittelt; auch wurde festgestellt, daß mit steigender Säurekonzentration der Wert für die spezifische Drehung ansteigt.

Nun hatten R. Willstätter und Zechmeister[1]) gefunden, daß die Drehung 1 proz. Dextroselösungen in Salzsäure höhrere Konzentrationen für längere Zeit konstant bleibt; so zeigte die 1 proz. Lösung in 39,9 gewichtsproz. Salzsäure innerhalb 40 Stunden eine gleichbleibende Drehung; dagegen wies eine 20,24 Gewichtsproz. Dextrose enthaltende Lösung in 37,6 gewichtsproz. Salzsäure, in welcher die Isomaltosebildung nach E. Fischer erfolgte, folgende Änderungen auf:

Frisch bereitet	$\alpha = 19{,}17°$
nach 160 Minuten	$\alpha = 20{,}22°$
nach 20 Stunden	$\alpha = 23{,}19°$.

Das Ergebnis jener und meiner Versuche mit 4,75% Dextrose enthaltenden Lösungen (s. Tabelle I) veranlaßte mich, die Beziehungen zwischen Dextrosekonzentration und Drehungserscheinungen etwas eingehender zu studieren. In meinen Versuchen mit 4,75 proz. Dextrosekonzentration blieb bei Anwendung 10 proz. Salzsäure der nach 5 Minuten erhaltene Wert von $\alpha_D = 55°$ innerhalb einer Beobachtungszeit von 37 Tagen konstant; bei 20 proz. Salzsäure dagegen ist der Anfangswert von $\alpha_D = 56{,}7°$ nach 24 Stunden bereits auf 57,8° gestiegen, steigt aber dann im Verlaufe mehrerer Tage kaum mehr an. Bei 29,8 proz. Salzsäure entspricht die Drehung nach 5 Minuten $\alpha_D = 58{,}9°$, beträgt nach 24 Stunden 60,8° und steigt von hier ab innerhalb mehrerer Tage weiter. Bei 46 proz. Salzsäure ist der Anstieg noch stärker; er erreicht nach 24 Stunden ein Maximum, das sich durch einige Zeit erhält; dann tritt ein Fallen der spezifischen Drehung ein, das dauernd anhält. Schon bei 20 proz. Salzsäure zeigt sich im Verlaufe eines Tages eine schwache Gelbfärbung; in der 29,8 proz. Salzsäure erscheint sie rascher und erreicht eine tiefere Nuance. 46 proz. Salzsäure bewirkt fast momentan Gelbfärbung, die Flüssigkeit färbt sich bald dunkler, so daß sie nach 24 Stunden bereits für die Ablesung im 189,4-mm-Rohre aufgehellt werden

[1]) l. c.

Digitized by Google

muß; die Zunahme der Färbung schreitet fort und bald setzt die Abscheidung braunschwarzer Massen, vermutlich Huminstoffe ein. Der Rückgang der Drehung bei dieser Säure ist demnach einer allmählich vor sich gehenden Zersetzung des Traubenzuckers zuzuschreiben.

Wesentlich anders liegen die Verhältnisse bei der Schwefelsäure. Ist hier die Erhöhung der Anfangsdrehung in konzentrierteren Säuren an sich schon geringer als bei der Salzsäure, so erfahren die Lösungen nur minimale nachträgliche Änderungen des Drehungsvermögens; selbst die Lösung in 41 proz. Schwefelsäure hielt sich während der Beobachtungsfrist von 4 Wochen konstant. Alle Lösungen in Schwefelsäure blieben bis zum Abschluß der Versuche völlig farblos.

Ich habe nun des weiteren das Verhalten von Dextroselösungen verschiedener Konzentration in Salzsäure wechselnden Gehaltes untersucht und dabei Zahlen erhalten, die ich in kürzester Fassung hier wiedergebe.

Dextrose in 10 proz. Salzsäure.

Dextrose: 0,95%		Dextrose: 1,85%	
nach 5 Min.	$\alpha_D = 55{,}58°$	nach 15 Min.	$\alpha_D = 54{,}22°$
„ 24 Stdn.	„ $= 55{,}58°$	„ 24 Stdn.	„ $= 54{,}22°$
„ 16 Tagen	„ $= 55{,}58°$		

Dextrose: 4,75%		9,5%	
nach 5 Min.	$\alpha_D = 54{,}5°$	nach 5 Min.	$\alpha_D = 54{,}2°$
„ 24 Stdn.	„ $= 54{,}5°$	„ 16 Tagen	„ $= 54{,}2°$

bleibt durch Wochen konstant.

Dextrose in 20 proz. Salzsäure.

Dextrose: 2,4%		4,75%	
nach 5 Min.	$\alpha_D = 56{,}81°$	nach 10 Min.	$\alpha_D = 56{,}7°$
„ 24 Stdn.	„ $= 56{,}81°$	„ 1 Tag	„ $= 56{,}7°$
„ 30 Tagen	„ $= 56{,}81°$	„ 3 Tagen	„ $= 57{,}8°$
		„ 37 „	„ $= 58{,}9°$
		„ 85 „	„ $= 58{,}9°$

Dextrose: 9,5%

nach 5 Min.	$\alpha_D = 56{,}03°$
„ 1 Tag	„ $= 56{,}03°$
„ 3 Tagen	„ $= 56{,}41°$
„ 11 „	„ $= 56{,}70°$
„ 30 „	„ $= 58{,}4°$

Digitized by Google

Dextrose in ca. 30 proz. Salzsäure.

Dextrose: 0,95%		Dextrose: 1,85%	
nach 5 Min.	$\alpha_D = 58{,}36°$	nach 15 Min.	$\alpha_D = 58{,}51°$
„ 1 Tag	„ $= 58{,}36°$	„ 1 Tag	„ $= 58{,}51°$
„ 4 Tagen	„ $= 61{,}14°$		
„ 16 „	„ $= 61{,}14°$		

Dextrose: 4,75%		Dextrose: 9,5%	
nach 5 Min.	$\alpha_D = 60{,}02°$	nach 5 Min.	$\alpha_D = 58{,}91°$
„ 1 Tag	„ $= 61{,}14°$	„ 1 Tag	„ $= 60{,}02°$
„ 13 Tagen	„ $= 63{,}40°$	„ 4 Tagen	„ $= 61{,}69°$
„ 20 „	„ $= 63{,}40°$	„ 10 „	„ $= 64{,}47°$
„ 66 „	„ $= 64{,}47°$	„ 16 „	„ $= 65{,}58°$
		„ 30 „	„ $= 67{,}25°$

Dextrose in 46 proz. Salzsäure.

Dextrose: 0,95%		Dextrose: 1,85%	
nach 10 Min.	$\alpha_D = 77{,}80°$	nach 15 Min.	$\alpha_D = 77{,}1°$
„ 1 Tag	„ $= 77{,}80°$	„ 1 Tag	„ $= 77{,}1°$
„ 4 Tagen	„ $= 77{,}80°$		
„ 10 „	„ $= 72{,}2°$		
„ 16 „	„ $= 69{,}47°$		

Dextrose: 4,75%	
nach 5 Min.	$\alpha_D = 75{,}03°$
„ 10 „	„ $= 75{,}59°$
„ 1 Tag	„ $= 77\,81°$
„ 16 Tagen	„ $= 70{,}02°$
„ 37 „	„ $= 62{,}2°$
„ 3 Monaten	„ $= 44{,}46°$

Die Zusammenstellung zeigt, daß die Drehung schwacher Dextroselösungen, namentlich bei geringeren Säurekonzentrationen durch Salzsäure geringere nachträgliche Änderungen erfährt als die stärkeren Lösungen. Bei Anwendung 10 proz. Salzsäure bleibt sie unabhängig von der Dextrosekonzentration längere Zeit konstant; auch 20 proz. Salzsäure ändert das Drehungsvermögen schwacher Dextroselösungen während längerer Zeit nicht; in höheren Dextrosekonzentrationen zeigt sich ein allmähliches Ansteigen. 30 proz. Salzsäure veranlaßt ein dauerndes Steigen der Drehung, das für höhere Konzentrationen stärker ist als für niedrige. 46 proz. Salzsäure verursacht nach einem anfänglichen Zuwachs der Drehung (in höheren D-Konzentrationen) bei allen Konzentrationen bald dauernd fortschreitende Zersetzung, die sich durch einen fortgesetzten Rückgang der Drehung zu erkennen gibt.

Digitized by Google

Drehungserscheinungen bzw. Mutarotationsverlauf einer Lösung von 4,75 g Dextrose in destilliertem Wasser, Salz- und Schwefelsäure wechselnder Konzentration.

Destilliertes Wasser.

t	T	α	$[\alpha]_D$	$\log b - \log(b-x)$	C
5	20,30	9,80	108,9	—	—
10	20,45	9,45	105,0	31,2	6,24
15	20,40	9,10	101,20	64,8	6,48
20	20,45	8,75	97,50	101	6,73
25	20,45	8,40	93,37	141	7,05
30	20,45	8,10	90,04	178,7	7,13
40	20,50	7,70	85,57	233,5	6,65
50	20,40	7,25	80,59	305,3	6,77
60	20,40	6,85	76,14	382,7	6,94
70	20,40	6,53	72,87	448,0	6,89
80	20,45	6,20	70,0	512	6,83
90	20,50	6,10	67,81	573,0	6,74
100	20,45	5,85	65,01	661	6,96
110	20,40	5,75	63,91	703,3	6,69
120	20,30	5,60	62,25	774	6,73
140	20,30	5,30	58,91	963,0	7,12
160	20,15	5,15	57,24	1101,2	7,10
180	20,10	5,10	56,69	1159,2	6,62
200	20,40	5,00	55,58	1305,0	6,69
220	20,40	4,95	55,03	1402,2	6,52
240	20,45	4,90	54,47	1527,2	6,49
260	20,40	4,90	54,47	1527,2	5,99
280	20,40	4,85	53,95	1793,0	6,20
300	20,40	4,80	53,30	2004,3	6,79
∞	20,00	4,75	52,80	—	—
					Mittel: 6,72

Destilliertes Wasser.

t	T	α	$[\alpha]_D$	$\log b - \log(b-x)$	C
5	20,10	9,80	108,9	—	—
10	20,15	9,40	104,5	35,8	7,16
15	20,40	9,05	100,7	69,1	6,98
20	20,50	8,70	96,72	107,0	7,13
25	20,30	8,40	93,37	141,0	7,05
30	20,40	8,15	90,6	171,8	6,87
35	20,40	7,85	87,26	213	7,07
40	20,40	7,65	85,03	241	6,88
50	20,45	7,15	79,48	323,0	7,17
60	20,40	6,80	75,59	391	7,11
70	20,40	6,50	72,25	460	7,08
80	20,40	6,25	69,50	527,2	7,02
90	20,50	6,05	67,25	589	6,93
100	20,40	5,80	64,47	682	7,10
120	20,40	5,60	62,25	774	6,73
140	20,40	5,40	60,02	890	6,59
160	20,40	5,20	57,80	1050	6,77
180	20,50	5,10	56,69	1159,2	6,62
200	20,40	5,05	56,44	1226,2	6,29
220	20,40	5,00	55,58	1305,3	6,07
240	20,40	4,95	55,00	1402,3	5,96
260	20,40	4,90	55,03	1527,0	5,98
280	20,40	4,90	54,47	1527,6	5,55
∞	20,20	4,75	52,80	—	—
					Mittel: 6,73

Digitized by Google

Salzsäure 0,0051%.

t	T	α	$[\alpha]_D$	$\log b - \log (b - x)$	C
5	20,20	9,75	108,4	—	—
10	20,45	9,35	103,9	36,2	7,24
15	20,45	8,95	99,49	75,7	7,57
20	20,40	8,65	96,15	108,0	7,20
25	20,40	8,40	93,37	136,1	6,80
30	20,40	8,20	91,17	161	6,44
45	20,40	7,60	84,48	244	6,97
50	20,40	7,10	78,93	328	7,28
60	20,40	6,75	75,03	389	7,24
70	20,40	6,55	72,87	447	6,83
80	20,40	6,30	70,02	508,6	6,77
90	20,40	6,05	67,25	585,0	6,88
100	20,40	5,90	65,68	638,4	6,72
120	20,40	5,55	61,69	795,9	6,92
140	20,50	5,40	60,02	921,6	6,82
160	20,50	5,20	57,80	1046	6,74
180	20,40	5,05	56,14	1222	6,98
200	20,45	4,95	55,03	1398	7,16
220	20,40	4,90	54,47	1522	7,08
240	20,40	4,85	53,91	1699	7,23
280	20,40	4,80	53,35	2000	7,27
∞	20,40	4,75	52,80	—	—
					Mittel: 7,00

Salzsäure 0,012%.

t	T	α	$[\alpha]_D$	$\log b - \log (b - x)$	C
5	20,00	9,75	108,4	—	—
10	20,50	9,30	103,9	36,2	7,24
15	20,20	9,00	100,0	70,58	7,06
20	20,35	8,55	95,00	119	7,94
25	20,40	8,25	91,68	154,9	7,74
30	20,45	7,95	88,37	193,8	7,75
35	20,45	7,75	86,14	221,8	7,39
40	20,45	7,50	83,36	259,6	7,42
50	20,45	7,10	78,93	328,9	7,31
60	20,50	6,80	75,59	387,2	7,04
70	20,55	6,55	72,87	443,7	6,83
80	20,35	6,15	68,36	552,8	7,37
90	20,40	5,90	65,68	638,3	7,50
100	20,40	5,80	64,47	677,8	7,13
120	20,40	5,50	61,15	823,9	7,16
140	20,35	5,25	58,42	1000,0	7,40
160	20,50	5,10	56,69	1154,9	7,45
170	20,40	5,10	56,69	1154,9	6,99
190	20,45	5,00	55,58	1301,0	7,03
210	20,40	4,95	55,03	1397,9	6,82
230	20,45	4,90	54,47	1522,9	6,77
250	20,40	4,85	53,91	1698,9	6,94
∞	20,40	4,75	52,80	—	—
					Mittel: 7,25
				In einem 2. Versuch betrug das Mittel	7,60
					7,42

Digitized by Google

Salzsäure 0,025%.

t	T	α	$[\alpha]_D$	$\log b - \log (b-x)$	C
5	20,00	9,70	107,8	—	—
10	20,40	9,30	103,4	36,6	7,32
15	20,45	8,90	98,93	76,5	7,65
20	20,45	8,50	94,48	120,5	8,04
25	20,30	8,20	91,15	156,7	7,84
30	20,40	7,90	87,82	196,3	7,85
35	20,40	7,60	84,48	239,7	7,99
40	20,40	7,30	81,14	288,0	8,23
50	20,50	6,90	76,70	362,1	8,05
60	20,40	6,55	72,87	439,3	7,99
65	20,40	6,40	71,14	477,1	7,95
70	20,40	6,25	69,48	518,5	7,98
75	20,50	6,10	67,81	564,2	8,06
85	20,45	5,90	65,68	633,9	7,92
95	20,50	5,70	63,36	716,8	7,96
105	20,45	5,45	60,58	849,5	8,49
115	20,45	5,40	60,02	881,7	8,01
135	20,40	5,15	57,24	1092,5	8,40
155	20,40	5,10	56,69	1150,5	7,66
165	20,45	5,00	55,58	1296,6	7,63
195	20,45	4,95	55,03	1393,5	7,33
∞		4,75	52,80	—	—
				Mittel:	7,92
			In einem 2. Versuch	„	8,12
				Mittel	8,02

Salzsäure 0,051%.

t	T	α	$[\alpha]_D$	$\log b - \log (b-x)$	C
5	20,10	9,60	106,7	—	—
10	20,50	9,15	101,7	42,3	8,46
15	20,35	8,70	96,71	89,1	8,91
20	20,40	8,35	92,80	129,4	8,63
25	20,40	8,00	88,96	173,8	8,69
30	20,45	7,70	85,57	215,9	8,63
40	20,35	7,10	78,93	314,6	8,89
50	20,40	6,70	74,47	396,7	8,79
60	20,50	6,35	70,58	481,6	8,76
70	20,30	6,05	67,25	571,8	8,79
80	20,40	5,75	63,91	685,7	9,14
90	20,40	5,60	62,25	756,3	8,90
100	20,40	5,45	60,58	840,6	8,85
110	20,45	5,25	68,36	986,7	9,39
120	20,35	5,20	57,80	1032,5	8,97
140	20,35	5,05	56,13	1208,6	8,95
160	20,45	4,95	55,00	1384,7	8,93
180	20,50	4,90	54,50	1509,6	8,63
200	20,40	4,85	53,91	1685,7	8,64
220	20,40	4,80	53,35	1986,7	9,24
240	20,45	4,80	53,35	1986,7	8,45
∞	20,20	4,75	52,80	—	—
				Mittel	8,83
			In einem 2. Versuch	„	9,00
				Mittel	8,91

Digitized by Google

Salzsäure 0,102%.

t	T	α	$[\alpha]_D$	$\log b - \log (b - x)$	C
5	20,20	9,50	105,6	—	—
10	20,40	8,95	99,48	53,44	10,70
15	20,30	8,45	93,90	108,49	10,85
20	20,30	8,00	88,90	164,8	11,00
25	20,40	7,60	84,48	221,8	11,08
30	20,50	7,25	80,59	278,7	11,15
35	20,30	6,95	77,25	334,2	11,14
40	20,45	6,70	74,50	386,6	11,05
45	20,40	6,45	71,70	446,2	11,15
50	20,40	6,25	69,50	521,3	11,58
55	20,40	6,05	67,25	562,7	11,25
60	20,50	5,90	65,57	615,9	11,20
70	20,45	5,60	62,25	747,2	11,49
80	20,20	5,45	60,58	831,5	11,09
90	20,50	5,30	58,91	936,3	11,01
100	20,45	5,15	57,24	1074,63	11,31
110	20,50	5,05	56,13	1199,5	11,42
130	20,50	4,95	55,03	1375,6	11,00
150	20,50	4,85	53,90	1676,7	11,56
170	20,45	4,80	53,30	1977,7	11,98
∞	20,40	4,75	52,80	—	—
				Mittel:	11,21
			In einem 2. Versuch	„	11,55
				Mittel:	11,38

Salzsäure 0,25%.

t	T	α	$[\alpha]_D$	$\log b - \log (b - x)$	C
5	20,00	9,20	102,8	—	—
10	20,40	8,35	92,86	92,0	18,41
15	20,30	7,70	85,57	178,5	17,85
20	20,30	7,15	79,50	268,1	17,87
25	20,40	6,70	74,47	358,3	17,91
30	20,40	6,35	70,58	444,2	17,77
35	20,40	6,05	67,25	534,4	17,81
40	20,40	5,75	63,91	648,3	18,52
45	20,40	5,55	61,69	745,3	18,63
50	20,50	5,40	60,02	835,4	18,56
55	20,50	5,30	58,91	908,0	18,16
60	20,50	5,20	57,80	995,1	18,09
65	20,55	5,10	56,69	1104,2	18,40
70	20,55	5,05	56,10	1171,2	18,02
75	20,55	5,00	55,58	1250,4	17,86
80	20,55	4,95	55,03	1347,8	17,96
85	20,50	4,90	54,47	1472,2	18,40
95	20,45	4,85	53,91	1648,3	18,31
115	20,50	4,80	53,37	1949,3	17,72
∞	20,50	4,75	52,80	—	—
				Mittel	18,12

Digitized by Google

Salzsäure 0,53%.

t	T	α	$[\alpha]_D$	$\log b - \log (b-x)$	C
5	20,40	8,60	95,66	—	—
10	20,45	7,40	82,20	162,2	32,4
15	20,45	6,60	73,30	318,3	31,8
20	20,40	6,00	66,69	488,5	32,6
25	20,40	5,60	62,20	656,0	32,8
30	20,40	5,35	59,50	807,3	32,3
35	20,45	5,20	57,80	932,2	31,1
40	20,50	5,05	56,13	1108,3	31,7
50	20,40	4,90	54,50	1409,4	31,3
60	20,50	4,85	53,91	1585,5	28,8
∞	20,40	4,75	52,80	—	—
					Mittel: 31,6

Salzsäure 0,53%.

t	T	α	$[\alpha]_D$	$\log b - \log (b-x)$	C
5	20,40	8,45	93,90	—	—
10	20,35	7,30	81,10	161,6	32,33
15	20,40	6,55	72,80	312,9	31,29
20	20,40	6,00	66,70	471,3	31,42
25	20,40	5,55	61,69	665,1	33,25
30	20,45	5,30	58,91	827,8	33,11
35	20,35	5,15	57,20	966,1	32,20
40	20,45	5,05	56,13	1091,1	31,17
50	20,45	4,90	54,50	1392,1	30,94
60	20,35	4,85	53,91	1568,2	28,50
∞	20,45	4,75	52,80	—	—
					Mittel: 31,36

Salzsäure 1,03%.

t	T	α	$[\alpha]_D$	$\log b - \log (b-x)$	C
5	19,80	7,90	87,81	—	—
7	20,45	7,20	80,00	—	—
10	20,40	6,40	71,14	280,8	56,2
12	20,35	6,10	67,80	—	—
15	20,40	5,65	62,75	544,1	54,4
18	20,35	5,30	58,90	—	—
20	20,40	5,20	57,80	845,1	56,3
23	20,40	5,10	56,70	—	—
25	20,40	5,00	55,60	1100,4	55,0
28	20,50	4,95	55,00	1197,3	52,0
35	20,35	4,85	53,91	1498,3	50,0
∞	20,40	4,75	52,80	—	—
					Mittel: 54,00
				In einem 2. Versuch	„ 54,90
					Mittel 54,45

Digitized by Google

Salzsäure 2,1%.

t	T	α	$[\alpha]_D$	$\log b - \log(b-x)$	C
5	20,40	6,40	71,14	—	—
7	20,40	5,75	63,9	226,4	113,2
10	20,45	5,25	58,36	550,9	110,2
12	20,45	5,10	56,70	727,0	103,8
15	20,40	4,90	54,5	1204,1	120,4
17	20,40	4,90	54,50	1204,1	100,3
20	20,40	4,85	53,91	1505,1	100,3
25	20,45	4,85	53,91	1505,1	75,2
∞	20,40	4,80	53,30	—	—

Mittel: 103,3

In einem 2. Versuch Mittel 100,3

Mittel: 101,8

Salzsäure 3,1%.

t	T	α	$[\alpha]_D$	$\log b - \log(b-x)$	C
5	20,30	5,70	63,40	—	—
7	20,30	5,20	57,80	352,18	176,0
10	20,50	4,95	55,00	778,15	155,6
12	20,45	4,85	53,91	1255,27	179,0
∞	20,40	4,80	53,30	—	—

Mittel: 170,2

In einem 2. Versuch „ 161,9

Mittel: 166,05

Salzsäure 3,62%.

t	T	α	$[\alpha]_D$
5	20,50	5,55	61,69
7	20,45	5,00	55,58
10	20,40	4,95	55,00
12	20,40	4,85	53,91
15	20,40	4,80	53,30
∞	20,40	4,80	53,30

Salzsäure 4,18%.

t	T	α	$[\alpha]_D$
4	20,20	5,50	61,10
5	20,50	5,25	58,45
7	20,50	4,90	54,47
10	20,50	4,80	53,35
∞	20,40	4,80	53,35

Salzsäure 5,1%.

t	T	α	$[\alpha]_D$
4	20,50	5,25	58,40
5	20,45	5,00	55,60
7	20,30	4,90	54,47
10	20,35	4,85	53,90
12	20,35	4,80	53,35
∞	20,40	4,80	53,35

Salzsäure 5,93%.

t	T	α	$[\alpha]_D$
4	20,50	5,15	57,20
5	20,50	5,00	55,60
7	20,50	4,90	54,47
10	20,50	4,85	53,90
∞		4,80	53,35

Salzsäure 7,04%.

t	T	α	$[\alpha]_D$
4	20,40	5,00	55,60
5	20,40	4,90	54,47
7	20,40	4,90	54,47
∞	20,20	4,85	53,91

Salzsäure 7,04%.

t	T	α	$[\alpha]_D$
4	20,20	5,00	55,60
5	20,40	4,85	53,91
7	20,40	4,85	53,91
∞	20,20	4,85	53,91

Salzsäure 8,00%.

t	T	α	$[\alpha]_D$
4	20,40	4,95	55,0
5	20,40	4,85	53,91
7	20,40	4,85	53,91
∞	20,20	4,85	53,91

Digitized by Google

Salzsäure 10%.

	t	α	α_D
	10	4,90	54,47
	12	4,90	54,47
	114	4,90	54,47
nach	1 Tag	4,90	54,47
„	3 Tagen	4,90	54,47
„	6 „	4,90	54,47
„	11 „	4,90	54,47
„	21 „	4,90	54,47
„	37 „	4,90	54,47

Salzsäure 20,07%.

	I.				II.		
	t	α	α_D		t	α	α_D
	9	5,10	56,59		5	5,10	56,69
	11	5,10	56,59		6	5,02	—
	96	5,10	56,59		7	5,08	—
nach	1 Tag	5,20	57,80		8	5,05	56,59
„	3 „	5,20	57,80		10	5,05	—
„	6 „	5,20	57,80		12	5,10	56,69
„	22 „	5,10	56,69	nach	8 Tagen	5,10	56,69
„	37 „	5,30	58,9				

Salzsäure 29,8%.

	t	α	α_D
	10	5,40	60,02
	22	5,40	60,02
	117	5,40	60,02
nach	1 Tag	5,50	61,17
„	3 Tagen	5,50	64,14
„	6 „	5,60	62,25
„	10 „	5,60	62,25
„	13 „	5,70	63,36
„	15 „	5,70	63,36
„	17 „	5,70	63,36
„	20 „	5,70	63,36

Salzsäure 46,0%.

	I.				II.		
	t	α	α_D		t	α	α_D
	8	6,75	75,03		5	6,70	74,5
	10	6,80	75,59		6	6,70	74,5
	11	6,80	75,59		7	6,70	74,5
	98	6,80	75,89	nach	2 Tagen	7,00	77,8
nach	1 Tag	7,00	77,81	„	4 „	7,00	77,8
„	3 Tagen	7,00	77,81	„	7 „	6,80	75,6
„	6 „	6,90	76,70				
„	11 „	6,60	73,36				
„	16 „	6,30	70,02				
„	21 „	5,80	64,47				
„	37 „	5,60	62,2				

Digitized by Google

Schwefelsäure 0,105%.

t	α	α_D
5	9,55	106,2
10	9,00	100,0
15	8,50	94,5
22	7,80	86,7
29	7,30	81,1
35	6,90	76,7
39	6,70	74,5
43	6,50	72,2
47	6,30	70,0
55	6,00	66,7
63	5,70	63,4
71	5,50	61,1
79	5,35	59,5
87	5,25	58,3
95	5,15	57,2
111	5,05	56,1
127	4,95	55,0
143	4,90	54,5
159	4,85	53,9
175	4,80	53,3
191	4,80	53,3
207	4,75	52,8
nach 24 Std.	4,75	52,8
„ 20 Tagen	4,80	53,3

Schwefelsäure 0,247%.

t	α	α_D
5	9,30	103,4
10	8,50	94,5
15	7,90	87,8
21	7,20	80,0
25	6,80	75,6
31	6,40	71,1
35	6,15	68,4
39	5,95	66,1
43	5,80	64,5
47	5,65	62,7
51	5,50	61,1
55	5,45	60,6
59	5,35	59,5
67	5,15	57,2
75	5,05	56,1
83	4,95	55,0
91	4,90	54,5
99	4,85	53,9
107	4,80	53,3
115	4,75	52,8
nach 24 Std.	4,75	52,8

Schwefelsäure 0,53%.

I.

t	α	α_D
5	8,80	97,8
10	7,95	88,4
14	7,35	81,7
16	7,10	78,9
20	6,60	73,3
24	6,20	68,9
26	6,05	67,2
30	5,75	63,9
34	5,50	61,1
38	5,30	58,9
46	5,10	56,7
54	5,00	55,6
62	4,95	55,0
70	4,85	53,9
78	4,80	53,3
86	4,75	52,8
nach 24 Std.	4,75	52,8

II.

t	α	α_D
5	8,85	98,4
10	7,90	87,9
14	7,05	78,4
16	6,90	76,7
20	6,40	71,1

Schwefelsäure 1,05%.

t	α	α_D
5	7,95	88,4
11	6,70	74,5
15	6,10	67,8
19	5,65	62,7
21	5,45	60,6
25	5,20	57,8
29	5,05	56,1
31	5,00	55,6
35	4,90	54,5
39	4,80	53,3
41	4,80	53,3
45	4,75	52,8
47	4,75	52,8
nach 24 Std.	4,75	52,8

Digitized by Google

Schwefelsäure 3,06%.

	t	α	α_D
	5	6,45	71,7
	10	5,25	58,4
	15	4,95	55,0
	19	4,85	53,9
	21	4,85	53,9
	25	4,80	53,3
nach	24 Std.	4,75	52,8
„	4 Tagen	4,75	52,8
„	30 „	4,75	52,8

Schwefelsäure 5,14%.

	t	α	α_D
	5	5,50	61,1
	10	4,95	55,0
	14	4,85	53,9
	16	4,85	53,9
	20	4,80	53,3
nach	24 Std.	4,80	53,3
„	4 Tagen	4,85	53,9
„	14 „	4,85	53,9
„	30 „	4,80	53,3

Schwefelsäure 10,17%.

	t	α	α_D
	5	5,10	56,7
	8	4,90	54,5
	19	4,85	53,9
	20	4,80	53,3
	21	4,80	53,3
nach	24 Std.	4,85	53,9
„	4 Tagen	4,85	53,9
„	14 „	4,85	53,9
„	30 „	4,90	54,5

Schwefelsäure 20,39%.

I.

	t	α	α_D
	5	5,00	55,6
	6	4,90	54,5
	9	4,90	54,5
nach	2 Tagen	4,80	53,3
„	29 „	4,90	54,5

II.

t	α	α_D
5	4,85	53,9
9	4,85	53,9

Schwefelsäure 30,38%.

I.

	t	α	α_D
	5	4,90	54,5
	8	4,90	54,5
nach	2 Tagen	4,95	55,0
„	12 „	4,95	55,0
„	29 „	5,00	55,6

II.

t	α	α_D
5	5,00	55,6
8	4,95	55,0

Schwefelsäure 41,19%.

I.

	t	α	α_D
	5	5,00	55,6
	6	4,95	55,0
	7	4,95	55,0
nach	2 Tagen	4,95	55,0
„	12 „	5,00.	55,6
„	29 „	5,10	56,7

II.

	t	α	α_D
	5	5,10	56,7
	6	5,05	56,1
	9	5,05	56,1
	13	5,05	56,1
nach	23 Tagen	5,10	56,7

Digitized by Google

Studien über Leitfähigkeitserniedrigung und Adsorption durch lyophile Kolloide[1]).

Von

M. Polányi.

(Eingegangen am 20. Januar 1920.)

Mit 1 Abbildung im Text.

I. Die Leitfähigkeitserniedrigung.

Löst man in einer reinen wäßrigen Lösung eines Kolloids einen Elektrolyten auf, so wird das Gemisch eine geringere elektrische Leitfähigkeit haben, als wenn man dieselbe Elektrolytenmenge — statt in der Kolloidlösung — in einem gleichen Volum reinen Wassers aufgelöst hätte. Für diese Erscheinung bieten sich zwei verschiedene naheliegende Erklärungen: die eine, daß das Kolloid einen Teil des Elektrolyten gebunden, d. h. adsorbiert hat; die andere, daß der Elektrolyt — trotzdem er frei im Dispersionsmittel gelöst bleibt — die Elektrizität doch schlechter leitet als sonst, weil die Anwesenheit der kolloidalen Teilchen die Wanderung der Ionen mechanisch behindert. Es steht zu erwarten, daß im allgemeinen beide Faktoren in Wirkung treten: es frägt sich also, ob und wie man deren Wirkung separieren kann?

Vorliegender erster Abschnitt soll sich mit der Bestimmungsweise des zweiten, letzgenannten Faktors beschäftigen. Hierbei wollen wir die Wirkung des Kolloids als dessen leitfähigkeitserniedrigende Wirkung — im engeren Sinne — bezeichnen, was wir gelegentlich auch kurz die „*L*-Wirkung" nennen werden. Der numerische Wert der *L*-Wirkung zeigt an, um wieviel Prozente das Gemisch, Elektrolyt und kolloidale Lösung, die Elektrizi-

[1]) Die nachfolgend mitgeteilten Versuche sind zuerst in meiner „Seenger"-Universitätspreisschrift (Budapest, März 1913) niedergelegt worden.

Digitized by Google

tät schlechter leitet, als das kolloidfreie Dispersionsmittel dieses selben Gemisches. Zählt man die L-Wirkung auf ein Gramm des aufgelösten Kolloids, so heißt sie die „spezifische L-Wirkung" des Kolloids. Bezeichnet also k_2 die Leitfähigkeit des Gemisches, Elektrolyt und kolloidale Lösung, $-k_1$ die Leitfähigkeit des Dispersionsmittels desselben Gemisches, $-f$ den Prozentgehalt des Gemisches am Kolloide, dann ist die spez. L-Wirkung:

$$L = 100 \frac{k_1 - k_2}{k_1} \cdot \frac{1}{f}. \qquad (1)$$

Vor allem sei hervorgehoben, daß die leitfähigkeitserniedrigende Wirkung der Kolloide wenig Ähnlichkeit zur entsprechenden Wirkung krystalloider Nichtelektrolyte bietet. Die Krystalloide setzen die Leitfähigkeit in dem Maße herab, als sie die Viscosität des Lösungsmittels erhöhen: für Kolloide gilt Ähnliches keineswegs, namentlich drücken diese die Leitfähigkeit viel weniger herunter, als die Fluidität. Dies ergibt sich bereits aus der bekannten Erfahrung, daß Salze in Gelatinegelen gelöst, nur um wenige Prozente schlechter leiten als mit einem gleichen Volum Wassers vermischt[1]) — trotzdem die Viscosität der Gelatinegele um mehrere tausend Prozente größer ist, als jene des Wassers.

Molekulartheoretisch hat man diese Erscheinung offenbar so aufzufassen, daß die Kolloidteilchen nicht — wie die Krystalloidmoleküle — von den wandernden Ionen mitgerissen werden. Die Viscosität des Gemisches wird nämlich für die Behinderung der Ionenwanderung maßgebend sein, insoferne jene Flüssigkeitsbewegung, welche von der Ionenwanderung verursacht wird, gleichen Charakter trägt, wie die gewöhnlichen makroskopischen Strömungen des Gemisches, also insbesondere, insoferne jene Flüssigkeitsmassen, welche von den Ionen in Bewegung gesetzt werden, die gleiche Zusammensetzung haben, wie das Gemisch als Ganzes: für Krystalloidlösungen ist also anzunehmen, daß dies zutrifft. Dagegen muß die Diskrepanz zwischen Leitfähigkeitserniedrigung und Viscositätserhöhung bei Kolloiden bedeuten, daß die Ionen in kolloidalen Lösungen nur das Dispersionsmittel in Bewegung setzen, die Kolloidteilchen aber kaum mitnehmen.

[1]) S. z. B. Dumansky: Zeitschr. f. physik. Chem. **60**, 553. 1907.

Digitized by Google

Warum diese merkwürdige Verschiedenheit zwischen der leitfähigkeitserniedrigenden Wirkung kolloider und krystalloider Stoffe eigentlich besteht, darüber gibt freilich dieses molekulare Bild keinen Aufschluß. Am naheliegendsten wäre wohl daran zu denken, der Unterschied sei dadurch bedingt, daß der durchschnittliche Abstand der Kolloidteilchen größer ist als der durchschnittliche Abstand der Krystalloidmoleküle: eine Berechnung dieser Abstände zeigt aber, daß dieser Ansatz schwerlich das Richtige trifft. Indem man nämlich das Molekulargewicht der Kolloide etwa auf das 30—100fache des Molekulargewichtes hochmolekularer Krystalloide ansetzt, erhält man, daß der durchschnittliche Abstand der Kolloidteilchen etwa 3—5 mal so groß ist, wie der durchschnittliche Abstand der Krystalloidmoleküle. Es sind also die fraglichen Abstände bei Kolloiden und Krystalloiden so ziemlich gleicher Größenordnung und deren Verschiedenheit mithin nicht so groß, daß man den prinzipiellen Unterschied in der Wirkung auf die Leitfähigkeit hieraus abzuleiten geneigt sein könnte.

Wie wenig die Anwesenheit der Kolloidteilchen die Bewegung der Ionen innerhalb des Dispersionsmittels stört, das soll aus den nachfolgenden Untersuchungen noch in bestimmterer, quantitativer Form hervorgehen.

Die zur Bestimmung der *L*-Wirkung angewendete Methode war sehr einfach: sie ging davon aus, daß, wenn eine in eine Pergamenthülse eingeschlossene kolloidale Lösung samt dieser Hülse in eine bestimmte Menge Wasser getaucht wird, die Diffusion durch die Hülse so lange andauern wird, bis die Konzentration der Krystalloide im umgebenden Wasser dieselbe wird, wie die Konzentration im Dispersionsmittel der kolloiden Lösung. Ist also das Diffusionsgleichgewicht erreicht, so kann die entstandene Lösung, welche die Hülse umgibt als das reine Dispersionsmittel der in der Hülse zurückgebliebenen kolloidalen Lösung betrachtet werden. Indem man also — nach Einstellung des Gleichgewichtes — einerseits die Leitfähigkeit der kolloidalen Lösung innerhalb der Hülse, andrerseits die Leitfähigkeit der Lösung außerhalb der Hülse bestimmt, hat man definitionsgemäß die *L*-Wirkung des fraglichen Kolloids unmittelbar festgestellt. Einige Ergebnisse dieser Methode — die man die Gleichgewichtsdialyse nennen könnte — sind in der nachfolgenden Tabelle 1 zusammengestellt.

Digitized by Google

Die Ergebnisse sind, wie man sieht, ziemlich verläßlich: sie schwanken um ca. $\pm 5\%$. — In einigen Fällen (Nr. 7, 10 und 11) wurde übrigens statt Anwendung der Gleichgewichtsdialyse einerseits die elektrolytfreie kolloide Lösung, andrerseits reines Wasser mit einem und demselben Elektrolyten gesättigt und dann die Leitfähigkeit der so gewonnenen Flüssigkeiten verglichen. Prinzipiell bietet dieses Verfahren freilich der Gleichgewichtsdialyse gegenüber nichts Neues.

Zum Verständnis der vorletzten Spalte der Tabelle bedarf der Begriff des „nichtleitenden Raumes" einer Erläuterung. Dieser Raum soll das vom Kolloide pro Gramm eingenommene Volum bezeichnen, wenn man dieses unter der Voraussetzung berechnet, daß die leitfähigkeitserniedrigende Wirkung des Kolloids nur durch den Umstand bedingt ist, daß die Kolloidteilchen durch ihre bloße Anwesenheit die Zahl der Ionen pro Kubikzentimeter verringern und außerdem den Weg der Ionen verlängern, indem sie diese dazu zwingen, Umwege zu machen. Stellt man sich die Kolloidteilchen kugelförmig vor, so kann man den nichtleitenden Raum aus einer Formel von Maxwell[1]) berechnen, welche lautet.

$$\frac{x_2}{x_1} = \frac{2\varphi}{3-\varphi}. \tag{2}$$

Hierin bedeutet x_1 die Leitfähigkeit des reinen Dispersionsmittels und x_2 die durch Anwesenheit der Suspension herabgedrückte Leitfähigkeit ist. In unserem Falle ist also $x_1 = k_1$ und $x_2 = k_2$. — Die Bedeutung von φ ergibt sich daraus, daß 100 $(1 - \varphi)$ der nichtleitender Raum ist, in Prozenten des Lösungsvolumens ausgedrückt. Bezeichnet man letztere Größe auf 1 g des Kolloids gerechnet, mit p, so folgt nach unwesentlichen Vernachlässigungen aus (2)

$$p = 100\,\frac{2}{3}\,\frac{k_1 - k_2}{k_1}\,\frac{1}{f} = \frac{2}{3}\,L. \tag{3}$$

Die Angaben der vorletzten Spalte der Tabelle I sind aus dieser Beziehung berechnet worden.

Aus den Zahlen sieht man vor allem, daß der nichtleitende Raum — welcher das spez. Volum der untersuchten Kolloide darstellt, in der Größe, wie dieses sich aus deren L-Wirkung berechnen läßt — nur wenig größer erscheint als das spezifische Volum kolloider Substanzen, welches (aus der Dichte kolloidaler

[1]) Maxwell, Magnetism and Elektricity 1881.

Digitized by Google

Tabelle I.

Laufende Nummer	Art des Eiweißes	Art des Elektrolyten	Art der Herstellung des Gleichgewichtes	Spezifische L-Wirkung	Nichtleitender Raum auf 1% Eiweiß	Überschuß d. L-Wirkung über den aus d. gewöhnlichen spez Volum des Eiweißes berech. Betrag derselb-n
1	Na-Caseinat	Konzentriertes NaCl	Beide Flüssigkeiten auf NaCl gesättigt	1,69	1,13	0,50
2	„	„	„	1,65	1,11	0,45
3	„	NaCl zu 0,8%	Durch Gleichgewichtsdialyse	1,57	1,03	0,37
4	„	„	„	1,67	1,12	0,42
5	„	„	„	1,50	1,01	0,32
6	„	„	„	1,50	1,02	0,33
7	Ca-Caseinat	Konzentriertes CaOH	Beide Flüssigkeiten auf CaOH gesättigt	2,40	1,60	1,21
8	Caseinemulsion	$^n/_{10}$-NaCl	Emulsion abfiltriert	1,86	1,21	0,67
9	„	„	„	1,90	1,24	0,71
10	Serum	Konzentriertes NaCl	Beide Flüssigkeiten auf NaCl gesättigt	2,47	1,64	1,27
11	„	„	„	2,56	1,70	1,36
12	„	$^n/_{10}$-NaCl	Durch Gleichgewichtsdialyse	2,49	1,64	1,29
13	„	Die Elektrolyte d. Serums	„	2,50	1,66	1,30
14	„	„	„	2,49	1,65	1,29

Lösungen berechnet) etwa 0,8 betragen dürfte. Die gefundene leitfähigkeitserniedrigende Wirkung ist also kaum größer, als man sie zu erwarten hätte, wenn man — bei Zugrundelegung des spezifischen Volums der kolloiden Substanz — nur die rein mechanische Wirkung der Anwesenheit der kolloiden Teilchen berücksichtigt, nämlich die Verdrängung des leitenden Mediums aus dem leitendem Raume und die Verlängerung der Ionenwege.

Nun beweist aber die Quellbarkeit kolloider Substanzen, daß die Kolloidteilchen einen Teil des Dispersionsmittels fest gebunden halten, und es bietet sich daher die naheliegende Annahme an, daß, insofern der „nichtleitende Raum" den Wert 0,8 übersteigt, dies der Vergrößerung der Kolloidteilchen durch eine wäßrige Hülle zuzuschreiben ist. Die ganze leitfähigkeitserniedrigende Wirkung hätte man also damit zu erklären, daß die Kolloidteilchen, umgeben von ihrer wäßrigen Hülle, rein mechanisch durch ihre Anwesenheit die Menge der leitenden Substanz

Digitized by Google

pro Kubikzentimeter herabsetzen und außerdem den Weg der Ionen verlängern.

Die Möglichkeit anderer Erklärungen scheint mir durch folgende Umstände ausgeschlossen: 1. Die *L*-Wirkung des Caseins war dieselbe, gleichviel, ob das Casein als „Natriumcaseinat" aufgelöst war, oder ob es bloß im ungelöst grobkörnigem Zustande suspendiert wurde. (Siehe Tab. I, Nr. 8 und 9.) 2. Die *L*-Wirkung tritt in weiten Grenzen zur Kolloidkonzentration proportional auf, wie dies die Abb. bestätigt.

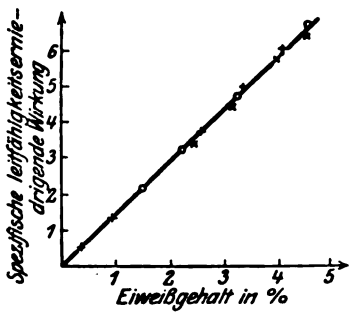


Abb. 1.

Versuch 1, mit + bezeichnet: Casein + 0,8% NaCl.
Versuch 2, mit × bezeichnet: Casein + 0,8% NaCl.
Versuch 8, mit ○ bezeichnet: Casein + konz. NaCl.

Diese beiden Erscheinungen sind, meiner Ansicht nach — wegen ihrer Einfachheit — nur mit der Auffassung vereinbar, daß die Ursache der leitfähigkeitserniedrigenden Wirkung in der unmittelbaren Nachbarschaft der Kolloidteilchen seinen Sitz hat, d. h. binnen Entfernungen, die klein sind im Vergleich zur gegenseitigen Entfernung der Teilchen: jede Annahme nämlich, welche Fernwirkungen der Kolloidteilchen voraussetzen würde, müßte zu Folgerungen komplizierter Natur führen, die zum beobachteten einfachen Sachverhalt im Widerspruch stünden, oder diesen nur als reinen Zufall gelten ließen.

Übrigens zeigen Abbildung und Tabelle, daß die *L*-Wirkung auch von Art und Konzentration des Elektrolyten ziemlich unabhängig ist, — was ebenfalls für die hier vertretene Anschauung spricht.

Allerdings muß hiergegen betont werden, daß es eine Gruppe von Erscheinungen gibt, welche notwendig darauf hinweist, daß unsere rein geometrische Erklärung der *L*-Wirkung als Folge der Verdrängung des leitenden Mediums und Wegverlängerung der Ionen noch einer Ergänzung bedarf. Eine leitfähigkeitserniedrigende Wirkung der angenommenen Art müßte offenbar auf alle im Gemische vorhandenen Ionen in gleichem Maße wirken, es könnte daher die Anwesenheit des Kolloides keinen Einfluß

Digitized by Google

auf die Überführungszahl haben. Diese Folgerung stimmt aber nicht mit der Erfahrung überein, denn die Überführungszahl ändert sich merklich bei Anwesenheit von Kolloiden, wie es Cybulski und Dunin Borkovsky[1]) nachgewiesen haben,

Tabelle II[2]).

Laufende Nummer	Eingeschaltete kolloidale Lösung	Zusammensetzung der Kette vor Einschaltung der kolloidalen Lösung	Spannung der Kette: vor Einschaltung der kolloidalen Lösung	Spannung der Kette: nach Einschaltung der kolloidalen Lösung	Einfluß der eingeschalteten kolloidalen Lösung auf das Diffusionspotential	Anmerkung
1	Pferdeblutserum mit 5% Eiweißgehalt	2 n-HCl/KCl	191,5	180,0	−11,5	Serum/KCl = 0
2	„	2 n-HCl/Diffusat des Serums	189,2	178,5	−10,7	Serum/Diffusat des Serums = 0
3	„	2 n-NaCl/$^n/_{10}$-NaCl	54,0	58,0	−1,8	„
	Diffusat des Pferdeblutserums	„	54,0	56,2		„
4	Doppelt verdünnt. Pferdeblutserum	„	54,0	56,5	−0,8	„
	Diffusat des verdünnt. Pferdeblutserums	„	54,0	55,7		„
5	5 proz. Stärkelösung	„	54,0	63,5	−0,5	Stärkelösung/Diffusat der Stärkelösung = 0
	Diffusat der 5 proz. Stärkelösung	„	54,0	63,0		
6	Stärkelösung	„	54,0	62,5	−0,5	„
	Diffusat der Stärkelösung	„	54,0	62,0		„
7	Stärkelösung in 5 proz. HCl-Lösung	3 n-HCl/KCl	156,6	175,9	+19,6	KCl/Stärkelösung = 0
8	„	„	140,0	160,5	+20,5	„

[1]) Cybulski und Dunin Borkowsky, Krak. Anz. 1909. S. 660.

[2]) 1. Wie aus der Tabelle ersichtlich, geschah die Bestimmung des Einflusses der kolloidalen Lösung durch Vergleich der Kettenspannung, wie sie sich nach Einschaltung der kolloidalen Lösung einerseits ergab, mit der Spannung andererseits, welche die Kette bei Einschaltung einer solchen kolloidfreien Lösung zeigte, die keine merkliche Spannungsdifferenz zur untersuchten kolloidalen Lösung aufwies. Als kolloidfreie Lösung wurde meist das Diffusat der kolloidalen Lösung verwendet. 2. Es wurden durchwegs Kalomelelektroden verwendet.

Digitized by Google

in dem sie feststellten, daß die Diffusionspotentiale von Säuren und Basen in kolloiden Medien modifiziert erscheinen. Insbesondere war dabei darauf zu schließen, daß meistens die Wanderung des Kations durch die Kolloide stärker behindert wird, als jene des Anions.

Bemerkt sei, daß diese Wirkung der Kolloide auf das Diffusionspotential bloß einen speziellen Fall jener allgemeinen Erscheinung darstellt, daß mikroheterogene Systeme das Diffusionspotential beeinflußen, welche Erscheinung zuerst von P. Girard[1]) bei Einschaltung verschiedener poröser Diaphragmen in Flüssigkeitsketten beschrieben wurde. Seinen Befund versuchte Girard durch die Annahme zu erklären, daß die Spannung der Flüssigkeitskette eine elektroendosmotische Strömung durch das eingeschaltete Diaphragma bewirkt, welche dasselbe elektrisch auflädet, und zwar in der zur Spannung der Kette entgegengesetzten Richtung. Diese Erklärung ist aber jedenfalls nicht richtig, wie dies die ergänzenden und berichtigenden Beobachtungen von Cybulski und Dunin Borkowsky zweifellos dargetan haben. Es handelt sich demnach jedenfalls um eine Erscheinung, die sich allgemein darin äußert, daß mikroheterogene Systeme die Überführungszahl in der sie umgebenden Flüssigkeit abändern.

Meinerseits möchte ich zum bisherigen Material (unter Hinweis auf Tabelle II) nur noch die Beobachtung zufügen, daß sorgfältige Messungen auch den Einfluß gelöster Kolloide auf das Diffusionspotential neutraler Salze nachweisen lassen. Auch habe ich zum Vergleich einige Messungen an Diaphragmen ausgeführt — welche in Tabelle III zusammengestellt sind. Hier erscheint Versuch 4 und 5 bemerkenswert, wo sich zeigt, daß durch dichte Kaolindiaphragmen sowie Silberpulver die Wanderungsgeschwindigkeit der OH' im Vergleich zur Geschwindigkeit der $Na^{\cdot}$ so stark herabgedrückt wird, daß das Verhältnis der beiden Geschwindigkeiten sich umkehrt: nimmt man nämlich die Überführungszahl des OH' in NaOH zu 0,82 an, so ergibt sich die elektromotorische Kraft der sub 4. und 5. verwendeten Kette ohne Diffusionspotential zu 0,061 Volt[2]) wogegen nach Einschaltung dichter Kaolin- bzw. Silberpulverdiaphragmen sich Werte von 0,068—0,075 Volt ergeben haben. Das bedeutet, daß die Einschaltung der Diaphragmen

[1]) P. Girard, Compt. rend. **146**, 927. 1908; **148**, 1047 u. 1186. 1909; **150**, 1446. 1910. Siehe auch F. Höber, Phys. Chem. der Zellen und Gewebe. 3. Aufl. Verl. W. Engelmann 1911. S. 307.

[2]) Die beobachtete Spannung von 0,022 Volts ergibt sich nämlich als Differenz des Konzentrations- und Diffusionspotentiales. Bezeichnet man ersteres mit π, so ist

$$0{,}022 = \pi - \pi \frac{U_{OH} - U_{Na}}{U_{OH} + U_{Na}},$$

wo U_{OH} und U_{Na} die Wanderungsgeschwindigkeiten von OH' und $Na^{\cdot}$ bezeichnen, welche zu 194 bzw. 44 angenommen werden sollen. Hieraus ist $\pi = 0{,}061$ Volt.

Digitized by Google

Tabelle III.

Laufende Nummer	Art der Elektroden	Beschreibung des Diaphragmenmateriales	Zusammensetzung der Kette ohne Einschaltung des Diaphragmas	Spannung in Millivolt		Einfluß des Diaphragma auf das Diffusionspotential
				vor Einschaltung des Diaphragma	nach Einschaltung des Diaphragma	
1	HgO	Kaolinpulver	n-NaOH/$^n/_5$-NaOH	17,5	50	32,5
					55	37,5
2	„	14 g Kaolinpulver mit 10 cm^3 $^n/_5$-NaOH verrieben	„	18,5	20,5	−2
					22,5	−4
3	„	14 g Kaolinpulver mit 5 cm^3 $^n/_5$-NaOH verrieben	„	21,0	62	−41
					63	−42
4	„	Die sub 3 verwendete Masse nach Trocknung an der Luft	„	22,0	72	−50
					73	−51
5	„	Silberpulver	„	22,0	68	−46
					75	−53
6	HgCl	Tonsilber	2 n-HCl/$^n/_{10}$-KCl	185,5	124	−59
7	„	Kaolinpulver	„	185,5	126	−59,1
8	„	„	„	185,5	145,2	+20,3
9	„	„	2 n-NaCl/$^n/_{10}$-NaCl	53,7	72,5	+18,8
10	„	„	„	54,0	70,5	+15,5

die Richtung des Diffusionspotentiales umgekehrt hat, was eben nur durch Umkehr des Verhältnisses der Wanderungsgeschwindigkeiten zustande kommen kann.

Indem wir nun zur leitfähigkeitserniedrigenden Wirkung der Kolloide zurückkehren, finden wir uns vor die Frage gestellt, auf welche Weise wohl jenes einfache geometrische Bild, das wir uns über das Zusammenkommen dieser Wirkung zurecht gelegt haben, abzuändern wäre, um den Einfluß der Kolloide auf die Überführungszahl erklärlich zu machen?

Es bedarf wohl keiner eingehenden Diskussion, daß die weitaus plausibelste Annahme, die man hierzu zur Ergänzung unseres Bildes einzuführen geneigt sein wird, darin besteht, daß die wäßrige Hülle der Kolloidteilchen für Ionen mehr oder weniger permeabel anzunehmen ist, und zwar für verschiedene Ionen in verschiedenem Ausmaße. So kann man es unter Beibehaltung des Grundbildes erklären, daß die Teilchen einzelne Ionen stärker behindern, andere weniger.

Jedoch so plausibel dies auch ist, wird man auf diese Erklärung nur dann eingehen dürfen, wenn es sich zeigt, daß sich

Digitized by Google

aus der vorgeschlagenen Annahme einer verschiedenen Durchlässigkeit der Wasserhülle der Kolloidteilchen zahlenmäßig Effekte ableiten lassen, welche die Höhe der tatsächlich gefundenen Werte erreichen — oder, wenn man den umgekehrten Weg gehend berechnet, wie groß die wäßrige Hülle und mithin die *L*-Wirkung der Kolloidteilchen sein muß, damit die gemessene Wirkung des Kolloids auf das Diffusionspotential durch die selektive Durchlässigkeit der Hülle erklärt werden könne — und nachher die so postulierte *L*-Wirkung der Hülle als mit der Erfahrung verträglich findet.

Die letztere Art der Diskussion gestaltet sich z. B. auf Versuch 3 der Tabelle 2 angewendet, folgendermaßen. Die Spannung der fraglichen Kette wäre ohne Diffusionspotential gleich 0,066 Volt[1]). Das Diffusionspotential selbst ist also gleich $0{,}066 - 0{,}054 = 0{,}012$ Volt. Dieses wird durch Einschaltung des Kolloids um 0,0016 Volt vermindert, also um 15%.

Will man hieraus die minimale notwendige Dicke der Kolloidwasserhaut berechnen, so hat man die Voraussetzungen über die Wirkungsweise dieser Schicht so zu wählen, daß deren Einfluß auf das Diffusionspotential bei gegebenen Dicke der denkbar größte sei. Dies wird offenbar dann der Fall sein, wenn die Wasserhaut das eine Ion gar nicht behindert, das andere aber überhaupt nicht durchläßt.

Durch diese Voraussetzung bleibt uns nur mehr die einfache Frage zu beantworten: um wieviel Prozente muß U_{Cl} herabgedrückt werden, wenn bei unverändertem U_{Na} eine Verminderung des Faktors $\frac{U_{Cl} - U_{Na}}{U_{Cl} + U_{Na}}$ um 15% zustande kommen soll? Mühelos erhält man die fragliche Ziffer: U_{Cl} müßte um 5,6% verkleinert werden, damit der gewünschte Effekt zustande komme. — Ebenso leicht machen wir auch den nächsten Schritt, der uns ermöglicht, unser Ergebnis mit der Erfahrung zu vergleichen. Wir beachten nämlich, daß, wenn wir U_{Cl} durch die Wasserhülle um 5,6% vermindert denken, und zugleich U_{Na} durch diese Hülle unbeeinflußt bleibt, dann die Summe

---

[1]) Es ergibt sich nämlich $\pi = 0{,}066$ aus $0{,}054 = \pi - \pi \frac{U_{Cl} - U_{Na}}{U_{Cl} + U_{Na}}$, wenn U_{Cl} und U_{Na} die Wanderungsgeschwindigkeiten von Cl' und Na' sind U_{Cl} zu 65, U_{Na} zu 44 angenommen wird.

Digitized by Google

$U_{Cl} + U_{Na}$ durch die Hülle um 3,4% vermindert wird, daß sich also die *L*-Wirkung der Hülle zu 3,4% ergeben muß.

Die *L*-Wirkung der Hülle ist nun jene Zahl, die sich in der letzten Spalte der Tabelle I aufgezeichnet findet. Die Zahlen sind dort auf 1% Kolloid reduziert, müssen also, wenn sie zum Vergleich herangezogen werden sollen, mit 5 multipliziert werden, da im behandelten Versuch 3 der Tabelle II das Serum 5% Eiweiß enthielt. Wählt man also das Mittel aus den Versuchen 10, 11 und 12 der Tabelle I, so erhält man (nach Multiplikation mit 5) als *L*-Wirkung der Hülle 6,5%, also eine Zahl, die wohl von gleicher Größenordnung ist, wie jene, die sich uns aus der Wirkung des Eiweißes auf das Diffusionspotential als untere Grenze der *L*-Wirkung ergeben hat (3,4%), diese untere Grenze aber (wie nötig) merklich übersteigt.

Diese Berechnungen zeigen also, daß es sehr gut gelingt, das von uns gebrauchte Bild der *L*-Wirkung von Kolloiden durch Ergänzung mit der Hypothese selektiver Durchlässigkeit der Kolloidhüllen auch zur Erklärung des Effektes der Kolloide auf das Diffusionspotential verwendbar zu machen.

Sollten wir mit dieser Erklärung das Richtige getroffen haben, so steht zu erwarten, daß überall, wo ein besonders großer Effekt des Kolloids auf das Diffusionspotential auftritt, sich stets auch eine größere *L*-Wirkung zeigt. Letzteres wäre also namentlich bei Säuren und Laugen zu erwarten, und es kann von diesem Standpunkte bemerkenswert erscheinen, daß die *L*-Wirkung des Caseins auf CaOH fast doppelt so groß ist, wie auf neutrale Lösungen. (Siehe Tab. I, Versuch 7.)

Man sieht, in welcher Richtung künftige Versuche liegen müßten, welche das hier entworfene provisorische Bild prüfen bzw. weiterbilden könnten.

II. Die Adsorption von Elektrolyten in kolloiden Lösungen.

Es sei 1 g eines Kolloids in 100 ccm Wasser gelöst; wir lösen dazu noch 1 g eines Elektrolyten auf: finden wir nun, daß die Elektrolytkonzentration im Dispersionsmittel kleiner als 1 ist, dann sagen wir, daß der Kolloid einen Teil des Elektrolytes adsorbiert hat, — finden wir dagegen die Konzentration im Dispersionsmittel größer als 1, so stellen wir negative Adsorption des Elektrolytes durch das Kolloid fest; — wenn Adsorption weder

Digitized by Google

im positivem noch im negativem Sinne aufgetreten ist, so wird der Elektrolytgehalt des Dispersionsmittels gerade 1% betragen.

Diesen Feststellungen kann man allerdings mit der Frage entgegentreten, ob es überhaupt zulässig ist, von einer einheitlichen Konzentration im Dispersionsmittel zu sprechen? Vieles (namentlich die Erscheinung der Quellung) spricht nämlich dafür, daß ein beträchtlicher Teil des Dispersionsmittels innerhalb der Wirkungssphäre der adsorbierenden Kräfte der Kolloidteilchen gelegen ist, welche innerhalb dieser Sphäre überall Konzentrationsverschiebungen hervorrufen, daß also für einen beträchtlichen Teil des Dispersionsmittels die Konzentration gar keinen gleichmäßigen Wert hat, sondern von Punkt zu Punkt variiert.

Wohl ist dieser Einwurf nicht von der Hand zu weisen, doch wollen wir trotzdem bei dem einfachen Bilde bleiben, das wir auch bisher gebraucht haben, wonach die Zusammensetzung des Dispersionsmittels praktisch als gleichmäßig zu betrachten ist, wobei die Wirkung der adsorbierenden Kräfte auf eine Hülle beschränkt zu denken ist, welche die Kolloidteilchen in geringer Dicke umgibt. In diese Hülle — deren Durchmesser klein ist im Verhältnis zur durchschnittlichen Entfernung der Kolloidteilchen — wollen wir uns die adsorbierte Substanz (gegebenenfalls das adsorbierte Lösungsmittel) verdichtet denken. Wir bleiben bei diesem Bilde, einerseits, weil es sich im vorigen Abschnitte bei Erklärung der L-Wirkung bewährt hat, andererseits, weil es auch die Theorie der Adsorption bestätigt, daß der adsorbierte Stoff sich größtenteils unmittelbar an der Oberfläche des Adsorbens verdichtet und sich nur wenig davon in der äußeren Sphäre der Adsorptionskräfte befindet[1]).

Hat man sich diesen Standpunkt festgelegt, so ergibt sich ohne weiteres, daß man die Adsorption eines Krystalloids durch ein Kolloid bestimmen kann, indem man eine bestimmte Menge des Krystalloids einem gemessenen Volum der kolloiden Lösung beimischt und dann die Konzentration im Dispersionsmittel (mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse) bestimmt, oder auch dadurch, daß man die gemeinsame Lösung eines Kolloids und Krystalloids mit reinem Wasser in bestimmten Verhältnis verdünnt und dann die entsprechende Verdünnung des Dispersionsmittels (mit der Gleichgewichtsdialyse) bestimmt.

[1]) S. Polányi, Ber. d. Deutsch. phys. Ges. 18, 75. 1916.

Digitized by Google

Bevor wir auf diese Methode und deren Ergebnisse näher eingehen, sei noch die Aufmerksamkeit auf folgendes gelenkt: Wenn man zu 100 ccm einer 1 proz. kolloiden Lösung 1 g eines solchen Krystalloids beimengt, der weder im positiven noch im negativen Sinne adsorbiert wird, so wird sich die Konzentration im Dispersionsmittel nicht zu 1% ergeben, sondern einen etwas höheren Wert zeigen, und zwar, weil in 100 ccm der kolloiden Lösung nicht 100 ccm Wasser enthalten sind, sondern (bei Annahme des spez. Gew. des Kolloids zu 0,8) bloß 99,2 ccm Wasser. Das aufgelöste 1 g des Krystalloids verteilt sich also bloß auf 99,2 ccm Wasser: es wird sich also dessen Konzentration (mit Gleichgewichtsdialyse gemessen) — bei Ausschluß sowohl positiver, wie negativer Adsorption — zu 1,008% ergeben.

Es äußert sich also der Umstand, daß der Kolloid einen Teil des Volums der Lösung einnimmt, in der Erscheinung, daß die Konzentration eines Krystalloids (der weder positiv noch negativ adsorbiert wird), im Dispersionsmittel gemessen höher erscheint, als wenn man sie auf das Gesamtvolum der kolloiden Lösung berechnet. Aus dem Überschuß der Konzentration im Dispersionsmittel über die Konzentration pro Volumeinheit der kolloiden Lösung läßt sich der Raum berechnen, den der Kolloid einnimmt: wir nennen diesen den nichtlösenden Raum. — Es versteht sich nun, daß der Unterschied zwischen den beiden genannten Konzentrationen im allgemeinen auch dann nicht verschwindet, wenn Adsorption des Krystalloids eintritt, doch sieht man gleichfalls leicht, daß etwa im Falle negativer Adsorption der (aus den Konzentrationsdifferenzen berechnete) „nichtlösende Raum" sich größer ergeben wird, als das Volum des Kolloids wirklich ist — und daß umgekehrt, im Falle positiver Adsorption der auf ähnliche Weise berechnete „nichtlösende Raum" kleiner ausfallen wird als das wirkliche Volum des Kolloids. Erklärlicherweise kann es im letzterem Falle — bei besonders starker positiver Adsorption — sogar vorkommen, daß die Konzentration des fraglichen Krystalloids pro Volumeinheit der Lösung größer ausfällt als die Konzentration im Dispersionsmittel. In solchem Falle wäre der „nichtlösende Raum" negativ, was offenbar keinen physikalischen Sinn hat. Doch sind so starke Adsorptionen bei Neutralsalzen und sonstigen krystalloiden Nichtelektrolyten selten, bei solchen Stoffen wird man also für den nichtlösenden

Digitized by Google

Raum stets positive Werte erhalten und man wird die Adsorption solcher Stoffe daher nur nachweisen können, indem man den nichtlösenden Raum berechnet und dessen Wert mit dem wirklichem Volum des Kolloids vergleicht. — Das heißt also, wenn das spezifische Volum des Kolloids (wie gewöhnlich) 0,8 ist, daß so oft der nichtlösende Raum pro Gramm Kolloidsubstanz kleiner als 0,8 erscheint, stets positive Adsorption vorhanden ist, dagegen ein Wert des nichtlösenden Raums der (pro Gramm) größer als 0,8 ist, ein Zeichen negativer Adsorption ist.

Die Formel für den nichtlösenden Raum ergibt sich durch leichte Überlegung in folgender Form. Mischt man zu 100 ccm einer 7 proz. Kolloidlösung Δc_1 Gramm eines Krystalloids und ist die dadurch hervorgebrachte Änderung der Konzentration des Dispersionsmittels an dem zugesetztem Krystalloide Δc_2, so ist der nichtlösende Raum p, pro Gramm Kolloidsubstanz in Volumprozenten der Lösung:

$$p = \frac{(\Delta c_2 - \Delta c_1) \cdot 100}{\Delta c_1 f} - .$$

Diesen Ausdruck erhält man sofort aus der unmittelbar einleuchtenden Beziehung, daß die Größe Δc_1 von Δc_2 um gleichviel Prozente übertroffen wird, als der nichtlösende Raum beträgt.

Offenbar muß sich daß Vorhandensein des nichtlösenden Raums auch dann äußern, wenn die gemeinsame (wäßrige) Lösung eines Kolloids und Krystalloids mit Wasser verdünnt wird und die Konzentration des Krystalloids im Dispersionsmittel vor und nach der Verdünnung gemessen wird: z. B., wenn man 100 ccm einer 1 proz. Eiweißlösung mit 100 ccm Wasser verdünnt, so wird die Konzentration des Dispersionsmittels nicht auf die Hälfte fallen, sondern (bei Abwesenheit von Adsorption) im Verhältnisse von $\frac{99{,}2}{199{,}2}$, — also um mehr als die Hälfte. Auch aus Beobachtungen dieser Art läßt sich der nichtlösende Raum berechnen. Man beachtet hierzu, daß bei Verdünnung eines Volums der Lösung von der Größe v um den Betrag v' das Dispersionsmittel wegen Anwesenheit des nichtlösenden Raums, — v-mal $\frac{pf}{100}$ — statt um $\frac{v+v'}{v}$ um $\frac{v\left(1-\frac{pf}{100}\right)+v'}{v\left(1-\frac{pf}{100}\right)}$

Digitized by Google

verdünnt wird. Es ist also

$$\frac{c_2}{c_1} = \frac{v\left(1 - \frac{pf}{100}\right) + v'}{v\left(1 - \frac{pf}{100}\right)}$$

und hieraus:

$$p = \frac{100}{f} - \frac{100\, v' c_1}{f v (c_1 - c_2)},$$

wo c_1 die Konzentration des Dispersionsmittels vor der Verdünnung, c_2 dieselbe Konzentration nach der Verdünnung ist.

Bemerkenswert ist, daß im Falle negativer Adsorption der nichtleitende Raum das Volum des Kolloids samt dessen wäßriger Hülle darstellt, also genau dasselbe Volum, das wir oben als nichtleitenden Raum gekennzeichnet haben. Tasächlich stimmt die Größe des nichtleitenden Raums in einigen Fällen negativer Adsorption, die wir beobachtet haben (Versuch 6, 7, 9, 10, 11 und 12 der Tabelle IV) nicht schlecht mit der Größe des nichtleitenden Raums überein[1]).

Zuletzt möge noch der Mechanismus der Adsorption von Krystalloiden durch Kolloide von einem gewissen Standpunkt kurz beleuchtet werden. Namentlich wollen wir nach den Bedingungen fragen, unter denen eine positive, bzw. eine negative Adsorption zu erwarten ist.

Aus der Thermodynamik ist uns die Beziehung gegeben[2]), daß Stoffe, welche den osmotischen Druck der Kolloide steigern, positiv adsorbiert werden, Stoffe, die den osmotischen Druck vermindern, negative Adsorption erleiden. Fügt man hinzu, daß die fortgesetzte Verminderung des osmotischen Druckes schließlich zur Koagulation führen muß, so werden wir zum Schlusse geleitet, daß koagulierende Stoffe negativ, die Koagulation behindernde Stoffe positiv adsorbiert werden müssen[3]).

[1]) Den nichtlösenden Raum kolloider Lösungen hat qualitativ zuerst Geffcken (Zeitschr. f. physik Chem. **49**, 298. 1904) bemerkt, bei Löslichkeitsbestimmungen von Gasen in kolloiden Lösungen; ferner hat auch P. Rona (Diese Zeitschr. **29**, 501. 1910) die Anwesenheit dieses Raumes beobachtet, indem er mit Hilfe der Kompensationsdialyse die „freie" NaCl Konzentration im Serum bestimmte und mit der Gesamtkonzentration des Serums an NaCl verglich.

[2]) Siehe Polányi, Zeitschr. f. physik. Chem. **88**, 622. 1914

[3]) Über einige Bedingungen, an die die Gültigkeit dieses Gedankenganges geknüpft ist, gibt meine zitierte Arbeit Aufschluß.

Digitized by Google

Tabelle IV.

Laufende Nr.	Zusammensetzung der kolloidalen Lösung vor dem Versuche	Bestimmungweise des nichtlösenden Raums	Nichtlösender Raum auf 1% Eiweiß bezogen	Nichtleitender Raum auf 1% Eiweiß bezogen
1	Na-Caseinat + 0,8% NaCl	Zusatz von 2 g NaCl zu 100 ccm Lösung	0,85	1,01
2	„	„	0,65	1,02
3	Na-Caseinat + 2,8% NaCl	„	−0,06	[1,01][1]
4	„	„	0,69	[1,01]
5	Serumglobulinhydrochlorid + 0,1% NaCl	Zusatz von 6 g NaCl zu 100 ccm Lösung	−2,2	—
6	Pferdeblutserum	Zusatz von 8 g KCl zu 100 ccm Lösung	1,8	[1,65]
7	Pferdeblutserum + 8% KCl	Zusatz v. 100 ccm Wasser zu 100 ccm Lsg.	2,1	[1,65]
8	Pferdeblutserum	Zusatz von 8 g $CaCl_2$ zu 100 ccm Lösung	0,53	[1,65]
9	Pferdeblutserum + 8% $CaCl_2$	Zusatz v. 100 ccm Wasser zu 100 ccm Lsg.	1,5	[1,65]
10	Pferdeblutserum	„	1,5	[1,66]
11	„	„	1,5	[1,65]
12	„	Zusatz von 6 g NaCl zu 100 ccm Lösung	1,6	[1,65]
13	„	Zusatz v. 12 g Traubenzucker zu 100 ccm Lsg.	0,44	[1,65]
14	Pferdeblutserum + konz. NaCl	„	0,13	[1,65]
15	Pferdeblutserum + 7% NaCl	Zusatz v. 25 g Traubenzucker zu 100 ccm Lsg.	0,69	[1,65]
16	„	„	0,63	[1,65]

Zur Prüfung dieses Schlusses bedarf es weiterer Versuche. Inzwischen möge hierzu nur die Bemerkung gemacht werden, daß ich eine wesentliche Behinderung der Eiweißkoagulation durch Traubenzucker nachweisen konnte und daß dementsprechend Traubenzucker (wie Tabelle IV zeigt) von Eiweiß merklich positiv adsorbiert wird.

Wollen wir uns diesen Zusammenhang zwischen der Beeinflussung des osmotischen Druckes und der Adsorption nun auch noch mechanisch versinnbildlichen, und zwar so, daß das Bild in den Rahmen jener einfachen Anschauung hineinpaßt, die wir bei der vorliegenden Arbeit bisher verwendet haben, so ist vor allem zu beachten, daß eine Erhöhung des osmotischen Druckes

[1]) Die eingeklammerten Werte sind aus anderen Versuchsreihen übertragen.

Digitized by Google

eine Vermehrung der Teilchenzahl des Kolloids bedeutet, — und entsprechend einer Erniedrigung desselben eine Verminderung der Teilchenzahl entspricht. Nun wird ein Teilchen (AA') — bestehend aus den Teilen A und A' — zerfallen, wenn jene Abnahme der potentiellen Energie, von der die allseitige Umhüllung der Teile A und A' durch das Lösungs- (Dispersions-) Mittel begleitet wird, größer ist als jene Zunahme des potentiellen Energie, welche die Abtrennung der Teile A und A' voneinander zur Folge hat. Es wird also das in einem bestimmten Lösungsmittel L stabile Teilchen (AA') zerfallen, wenn das Lösungsmittel L durch ein andres Lösungsmittel L' vertauscht wird, welches die Eigenschaft hat, bei der allseitigen Umhüllung der Teilchen A und A' mehr potentielle Energie frei zu machen als L, d. h. durch A und A' stärker angezogen wird als L. Von ähnlicher Wirkung, wie der Austausch des Lösungsmittels L durch L', wird auch die Zumischung eines solchen Stoffes zum Lösungsmittel sein, welcher von A und A' stärker als das Lösungsmittel angezogen wird, — ein solcher Stoff ist aber einer, der positiv adsorbiert wird, womit die gesuchte Schlußfolgerung erreicht ist.

Analog kann man freilich auch umgekehrt schließen, daß eine Vereinigung mehrerer Kolloidteilchen erfolgen wird, wenn dem Lösungsmittel ein Stoff zugemischt wird, den die Teilchen schwächer anziehen als das Lösungsmittel selbst, — also ein Stoff, der negativ adsorbiert wird.

Der thermodynamische Zusammenhang zwischen Beeinflussung des osmotischen Druckes und Adsorption schließt sich also jenem einfachem Bilde gut an, das wir uns über die oben behandelten Erscheinungen in kolloiden Lösungen gebildet haben.

Zum Schluß sei in dankbarer Erinnerung an meinen Lehrer, Prof. Franz Tangl, noch erwähnt, daß vorliegende Studie in dem unter seiner Leitung gestandenem path. chem. Institut der Universität Budapest (im Winter 1911/12) durchgeführt wurde.

Karlsruhe, Dez. 1919.

Digitized by Google

Ursachen der Leitfähigkeit von Caseinlösungen[1]).

Von

L. Mándoki und M. Polányi.

(Eingegangen am 20. Januar 1920.)

Die elektrische Leitfähigkeit lyophiler Kolloide ist hauptsächlich an Eiweißlösungen studiert worden. Als Grundergebnis der vielen diesbezüglichen Untersuchungen gilt zur Zeit, daß das elektrolytfreie Eiweiß nicht merklich leitet, sich also analog zu den lyophoben Kolloiden verhält, daß aber demgegenüber die Eiweißsalze vorzügliche Leiter sind.

Als reine Lösungen von Eiweißsalzen werden jene neutralen Lösungen betrachtet, die durch Sättigung bzw. Neutralisierung von Säuren oder Basen mit gewissen Eiweißsorten hergestellt werden. Das bestuntersuchte Beispiel dieser Art ist die „Alkalicaseinatlösung", welche bereitet wird durch Neutralisierung von verdünnter Alkalilösung mit Casein: z. B. wird eine $^n/_{200}$-Natronlauge durch Auflösung von etwa 1% Casein neutralisiert und man findet, daß die entstandene Lösung ziemlich gut leitet — etwa so, wie $^n/_{350}$-NaCl.

Es galt nun bisher als erwiesen, daß diese Leitfähigkeit vom Casein selbst herrührt, umsomehr, als aus Caseinlösungen der beschriebenen Art bei Dialyse durch Pergamentschläuche keine leitenden Bestandteile hinausdiffundieren. Durch letztere Beobachtung (die wir unsererseits bestätigen können) schien seine sichere Grundlage zur Erforschung der Caseinlösungen geboten, und demnach wurde auch von mehreren Forschern, so namentlich von Laqueur und Sackur[2]), wie auch besonders von T. B. Robertson[3]), ein ausgedehntes Versuchsmaterial

[1]) Eine vorläufige Mitteilung über die nachstehend beschriebene Erscheinung findet sich bereits in der „Seenger" Preisschrift von 1912/13 der Universität Budapest (Verf.: M. Polányi).

[2]) Laqueur und Sackur, Zeitschr. f. physik. Chem. **41**, 672. 1902.

[3]) T. B. Robertson, Die physikalische Chemie der Proteine. Th. Steinkopf. Dresden 1912.

Digitized by Google

über die elektrische Leitfähigkeit der Eiweißsalze angesammelt, und wurden aus diesem mehrfach auch theoretische Folgerungen abgeleitet[1]).

Hiergegen sucht vorliegende Notiz die Aufmerksamkeit auf eine Beobachtung zu lenken, welche der Auffassung, daß die Caseinsalze gute Leiter der Elektrizität sind, jede Grundlage zu entziehen scheint: es ließ sich nämlich feststellen, daß aus denselben neutralen Caseinlösungen, aus denen durch Pergamentschläuche nichts abgeht, durch Fischblasen massenhaft leitende Bestandteile austreten, obzwar die Fischblase das Casein zurückhält. — Die Lösung dieser leitenden Stoffe ist neutral; trübt sich weder mit Sulfosalicylsäure noch mit Essigsäure; enthält Stickstoff, der sich fast vollständig mit Formol titrieren läßt. Der Quotient aus Leitfähigkeit und Stickstoffgehalt ist mehrfach größer als der entsprechende Quotient der Caseinlösung. (Siehe Tab. I.)

Diese Merkmale der durch die Fischblase diffundierten leitenden Stoffe deuten alle darauf hin, daß es sich hierbei um Zersetzungsprodukte des Caseins handelt, deren Entstehung wohl mit dem Auflösungs- bzw. Neutralisierungsprozeß in Verbindung stehen dürfte. Diese Annahme wird zur Gewißheit durch die Beobachtung, daß die Leitfähigkeit der Lösung der fraglichen Stoffe beim Stehen spontan anwächst. So stieg die Leitfähigkeit einer Probe im Eisschrank in 10 Tagen von $13{,}9 \cdot 10^{-5}$ auf $29{,}3 \cdot 10^{-5}$, bei einer anderen Probe von $4{,}22 \cdot 10^{-5}$ auf $8{,}5 \cdot 10^{-5}$. Nur die sich weiter zersetzenden Zerfallsprodukte des Caseins können diese Erscheinung bedingen.

Letztere Erscheinung führt übrigens zur Vermutung, daß auch die neutrale Caseinlösung selbst sich beim Stehen zersetzen und namentlich leitende Bestandteile abspalten dürfte. Dies tritt nun erfahrungsgemäß wirklich zu: so fand Robertson[2]), daß eine genauestens neutralisierte Caseinlösung binnen 24 Tagen zur Hälfte zerfällt und daß jede geringste basische Reaktion diesen Zerfall stürmisch beschleunigt. — Bedenkt man nun weiter, daß das Casein, um in Lösung gebracht zu werden, stundenlang

[1]) Siehe auch z. B. H. Handovsky, Die neueren Fortschritte in der experimentellen Kolloidchemie der Eiweißkörper. Kolloid-Zeitschr. 7, 183 u. 262.

[2]) Robertson, l. c. S. 350.

Digitized by Google

Tabelle I.

Laufende Nummer	Zusammensetzung der zum Versuch gebrauchten Caseinlösung	Dauer der Dialyse	Leitfähigkeit der in der Dialysierhülse zurückbleibenden Lösung (der „Lösung I“)	Leitfähigkeit des außerhalb der Dialysierhülse entstandenen Lösung (der „Lösung II“)	Leitfähigkeit der „Lösung I“ bezogen auf 1% Stickstoffgehalt	Leitfähigkeit der „Lösung II“ bezogen auf 1% Stickstoffgehalt	Nachweisbarer Anteil des Zersetzungsprodukte an der Leitfähigkeit d. Caseinlösung	Eigenschaft der „Lösung I“	Eigenschaft der „Lösung II“
1	67×10^{-5} äqu. NaOH pro g Casein	2×24 Std.	$32{,}3\times10^{-5}$ 20° C	$23{,}3\times10^{-5}$ 20° C	$89{,}7\times10^{-5}$ 20° C	—	72%	$R^{1})=1{,}33617$ 23° C	$R=1{,}33290$ 23° C
2	67×10^{-5} äqu. NaOH pro g Casein	36 Std.	$27{,}3\times10^{-5}$ 20° C	$23{,}0\times10^{-5}$ 20° C	162×10^{-5} 20° C	—	85%	$R=1{,}33476$ 23° C	$R=1{,}33318$ 23° C
3	50×10^{-5} äqu. NaOH pro g Casein	5×24 Std.	$39{,}0\times10^{-5}$ 20° C	$29{,}0\times10^{-5}$ 20° C	151×10^{-5} 20° C	537×10^{-5} 20° C	74%	$R=1{,}33520$ 23° C	$R=1{,}33310$ Stickstoffg. = 0,054% 23° C
4	50×10^{-5} äqu. NaOH pro g Casein	3×24 Std.	$23{,}3\times10^{-5}$ 20° C	$22{,}6\times10^{-5}$ 20° C	105×10^{-5} 20° C	390×10^{-5} 20° C	97%	$R=1{,}33488$ 23° C	$R=1{,}33321$ Stickstoffg. = 0,058% 23° C
5	50×10^{-5} äqu. NaOH pro g Casein	36 Std.	$58{,}0\times10^{-5}$ 20° C	$49{,}2\times10^{-5}$ 20° C	124×10^{-5} 20° C	—	88%	$R=1{,}33709$ 22,6° C	$R=1{,}33325$ 22,6° C
6	50×10^{-5} äqu. NaOH pro g Casein	3×24 Std.	$29{,}0\times10^{-5}$ 20° C	$32{,}0\times10^{-5}$ 20° C	180×10^{-5} 20° C	—	110%	$R=1{,}33428$ 23° C	$R=1{,}33315$ 23° C
7	Eine auf Lackmus neutrale Lösung von Casein in Natronlauge	2×24 Std.	$44{,}84\times10^{-5}$ 19,4° C	$17{,}8\times10^{-5}$ 19,4° C	160×10^{-5} 19,4° C	1618×10^{-5} 19,4° C	39%	Stickstoffgeh. = 0,280%	Stickstoffgeh. = 0,011%
8	Eine auf Lackmus neutrale Lösung von Casein in Natronlauge	2×24 Std.	$45{,}11\times10^{-5}$ 19,5° C	$13{,}52\times10^{-5}$ 19,5° C	166×10^{-5} 19,5° C	1583×10^{-5} 19,5° C	30%	Stickstoffgeh. = 0,272%	Stickstoffgeh. = 0,012%

[1]) R bedeutet den Brechungsindex bei der danebenstehenden Temperatur.

Digitized by Google

mit stark basisch reagierenden Lösung geschüttelt wird, so folgert man notwendig, daß sich während des Auflösungsvorganges bedeutende Quantitäten von Zersetzungsprodukten anhäufen müssen. Man kann sagen, daß diese Überlegung an sich schon dazu hätte führen sollen, daß aus der Leitfähigkeit der Caseinlösung keine Schlüsse auf die Leitfähigkeit des Caseins selbst gezogen werden dürfen.

Eine quantitative Orientierung über unsere Beobachtungen gibt Tabelle I. Einige Ultrafiltrationsversuche zeigt Tabelle II. Letztere Methode scheint zur Abtrennung der leitenden Bestandteile aus Caseinlösungen weniger geeignet zu sein. Ebensowenig erfolgreich war die Trennung durch freie Diffusion. (Siehe Tab. II.)

Tabelle II[1]).

Nr.	Leitfähigkeit und Caseingehalt der Caseinlösung	Leitfähigkeit und Caseingehalt des Ultrafiltrates	Wenigstens wie viel Prozent der Leitfähigkeit der Caseinlösung machen die Zersetzungsprodukte aus?
1	$98{,}64 \times 10^{-5}$ 2,47 % K-Caseinat	$83{,}92 \times 10^{-5}$ 1,79 %	46 %
2	$94{,}99 \times 10^{-5}$ K-Caseinat	$74{,}31 \times 10^{-5}$ 1,61 %	30 %
3	$101{,}4 \times 10^{-5}$ 3,5 % Na-Caseinat	$93{,}68 \times 10^{-5}$ 2,56 %	32 %
4	$90{,}26 \times 10^{-5}$ 2,61 % Na-Caseinat	$57{,}91 \times 10^{-5}$ 1,31 %	37 %
5	$87{,}30 \times 10^{-5}$ 3,4 % Na-Caseinat	$43{,}14 \times 10^{-5}$ 1,32 %	17 %
6	$76{,}89 \times 10^{-5}$ 4,19 % Na-Caseinat	$20{,}55 \times 10^{-5}$ 0,656 %	13 %
7	$78{,}98 \times 10^{-5}$ 2,73 % Na-Caseinat	$47{,}47 \times 10^{-5}$ 1,14 %	30 %
8	$72{,}57 \times 10^{-5}$ 4,15 % Na-Caseinat	$30{,}07 \times 10^{-5}$ 1,32 %	13 %
Scheidung durch freie Diffusion. (Dauer der Diffusion: 4×24 Std.)			
9	$69{,}10 \times 10^{-5}$ 3,03 % Na-Caseinat	$25{,}86 \times 10^{-5}$ 0,704 %	33 %

Es dürfte auffallen, in der 5. Spalte der Tabelle I, wie groß die Schwankungen sind (über 100%), welche die auf 1% Stickstoff berechnete Leitfähigkeit der verschiedenen Caseinlösungen aufweist. Ähnliches finden wir auch bei Robertson[2]): Die

[1]) Zur Ultrafiltration wurden 1,5 proz. Gelatinefilter der Firma Schleicher & Schütt benutzt. Der Filtrationsdruck war 3 Atm.

[2]) Robertson, l. c. S. 190—209.

Digitized by Google

auf 1% Stickstoff entfallende Leitfähigkeit schwankt bei ihm zwischen dem Wert von $124{,}10^{-5}$ und $310{,}10^{-5}$, je nachdem die Lösung auf Lackmus oder auf Phenolphthalein bzw. auf einen zwischen diesen beiden Grenzen liegenden Alkalitätspunkt neutralisiert wurde. Dies erklärt sich leicht dadurch, daß während der Auflösung des Caseins umsomehr Zersetzungsprodukte entstehen, je mehr Alkali dabei dem Casein zugesetzt wird.

Wir schließen: Die Leitfähigkeit der neutralen Caseinlösungen beweist nicht, daß das in Lösung befindliche Eiweiß ein guter Leiter ist, es steht sogar fest, daß die Leitfähigkeit dieser Lösungen zu großem Teil durch Zersetzungsprodukte des Caseins verursacht wird.

Bemerkt sei noch, daß die Theorie der gut dissoziierenden Eiweißsalze, die sich hauptsächlich auf die Erfahrungen an Caseinlösungen gründet, sich außerdem noch auf die gute Leitfähigkeit von Lösungen stützt, die man durch Neutralisation von Säuren mit Serumglobulin oder Ovomucoid bereitet. Auch für die Revision letzterer Beobachtungen dürften die obigen Methoden geeignet sein.

Digitized by Google

Refraktometrische Untersuchungen über die Reaktionen zwischen isolierten Krebszellen und Blutserum (Freund-Kaminersche Reaktionen).

Von

Robert Koritschoner und **Otto Morgenstern.**

(Aus der Prosektur der Krankenanstalt Rudolfstiftung in Wien.)

(Eingegangen am 22. Januar 1920.)

I. Mitteilung[1]).

E. Freund und G. Kaminer haben zum Nachweis der von ihnen entdeckten Reaktionen zwischen Blutserum und isolierten Krebszellen[2]) folgende Methode ausgearbeitet. Sie setzten zu Blutserum nach bestimmten Vorschriften[3]) präparierte Krebszellen zu und zählten in der Zeiss-Thomaschen Zählkammer die unter dem Mikroskope intakt erscheinenden Zellen bei Beginn der Versuche sowie nach 24stündiger Einwirkung des Serums auf die Zellen. Bei der Einwirkung von Seris Nichtcarcinomatöser erfuhr die Zahl der intakt aussehenden Krebszellen eine Verminderung, es wurden Carcinomzellen „zerstört", bei der Einwirkung von Seris Carcinomkranker blieb die Zahl der intakten Krebszellen unverändert.

In einem anderen Gedankengange war Neuberg[4]) zu einem analogen Resultate gekommen; bei der Verfolgung der Fermentvorgänge beim Carcinom prüfte er die Einwirkung von Blutserum Carcinomatöser auf Krebsmaterial neben der Einwirkung

[1]) Die zeitweilige Abwesenheit des einen von uns vom Institute veranlaßte uns zur Veröffentlichung der bisherigen Resultate. Die Weiterführung der Untersuchungen ist geplant.

[2]) Wien. klin. Wochenschr. **23**, 10. 1910; diese Zeitschr. **26**, 312. 1910.

[3]) Wien. klin. Wochenschr. **23**, 10. 1910; diese Zeitschr. **26**, 312. 1910. Vgl. auch diese Zeitschr. **84**, 283. 1917.

[4]) Diese Zeitschr. **26**, 344. 1910.

Digitized by Google

von normalem Menschen- oder Rinderserum. Die Digestion von Krebszellen in diesen ergab größere Mengen von koagulablem Stickstoff als die Digestion von Krebszellen mit Carcinomserum. Unseres Wissens finden sich über die klinische Verwendung dieser Beobachtung keine Angaben.

Der Nachweis des Eintretens oder Ausbleibens der Freund-Kaminerschen Reaktionen beruht demnach im wesentlichen auf einer Beurteilung der äußeren Form des verwendeten präparierten Zellmaterials. Die Beurteilung, ob eine Zelle noch als unverändert oder bereits als zerstört zu bezeichnen ist, erfordert naturgemäß große Übung und birgt immer ein subjektives Moment in sich. Durch die Verwendung des Zellaussehens als Kriterium wird außerdem ein Ausgangspräparat erforderlich, das tunlichst nur intakte Zellformen enthält. In dieser Hinsicht befriedigendes Material ist aber nur in seltenen Fällen erhältlich.

Wir versuchten daher die Anwendung eines anderen Reaktionskriteriums. Wir nahmen an, daß sich die physikalischen Eigenschaften des Blutserums durch die Reaktionen mit den zugefügten Krebszellen ändern. Die Bestimmung einer physikalischen Konstante des Serums kurz nach dessen Zusammenbringen mit den Carcinomzellen und eine zweite Bestimmung nach 24stündiger Einwirkungsdauer mußte uns dann aus der Ungleichheit oder Gleichheit der beiden ermittelten Werte die Entscheidung ermöglichen, ob Reaktionen eingetreten oder ausgeblieben waren. Wir führten nun solche Messungen am Brechungsindex des Serums aus, da die Bestimmung dieser Konstante mit Hilfe des Eintauchrefraktometers sehr leicht und mit großer Genauigkeit ausführbar ist und bei Verwendung des Hilfsprismas nur wenige Tropfen Serum erfordert. Auch ist die Änderung des Brechungsindexes sehr häufig, in der letzten Zeit z. B. von de Crinis und Pregl[1]), als Kriterium für das Eintreten von Reaktionen verwendet worden.

Der Rückschluß aus der Änderung des Brechungsvermögens auf erfolgte Zerstörung von Krebszellen in unserem Reaktionssystem ist nur dann zulässig, wenn eine Änderung des Brechungsindexes durch andere Vorgänge ausgeschlossen ist oder wenn eine solche durch Nebenreaktionen bedingte Änderung zahlenmäßig ermittelt und in Rechnung gestellt werden kann.

[1]) Fermentforschung 2, I, 58.

Digitized by Google

Es wurden daher zunächst diese Verhältnisse experimentell geprüft. Nach einer größeren Reihe von Vorversuchen sind wir schließlich zur nachstehend beschriebenen Arbeitsweise gelangt. Die erforderlichen Blutmengen wurden durch Venenpunktion nüchternen Patienten entnommen und nach erfolgter Gerinnung noch mehrere Stunden im Eisschranke aufbewahrt. Dadurch sollten etwa durch Nachgerinnung bedingte Fehlerquellen ausgeschaltet werden. Dann wurde das abpipettierte Serum bis zur völligen Entfernung noch suspendierter roter Blutkörperchen zentrifugiert, da diese die Ablesung im Refraktometer erschweren.

Die für die Versuche erforderlichen Carcinomzellen wurden aus Leichenmaterial, im wesentlichen nach den Vorschriften von E. Freund und G. Kaminer[1]), gewonnen.

Tunlichst guterhaltene Carcinommetastasen wurden zu etwa nußgroßen Stücken zerkleinert und durch eine vierfache Lage von beutelförmig gefalteter hydrophiler Gaze in eine Lösung von 10 g NaH_2PO_4 + 6 g NaCl + 1000 g H_2O gepreßt. Fast alles Bindegewebe und Organgewebe bleibt hierbei in der Gaze zurück. Die Suspension der Zellen wurde dann in ein Standgefäß gefüllt und im Eisschranke durch ungefähr 12 Stunden in Berührung mit der Natriumhydrophosphatlösung gelassen. Hierbei sedimentieren die Zellen. Die überstehende Flüssigkeit wurde nun abgehebert und durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt. Dann wurden die Zellen durch kräftiges Schütteln in der physiologischen Kochsalzlösung gleichmäßig verteilt und neuerlich im Eisschranke absitzen lassen. Dies wurde 4—6 mal wiederholt, so lange, als die Kochsalzlösung noch blutig tingiert erschien[2]). Die derart vorbehandelten sedimentierten Zellen wurden schließlich in ihr vierfaches Volumen bei Zimmertemperatur gesättigter Kochsalzlösung eingetragen und in einer verschlossenen Vorratsflasche im Eisschranke aufbewahrt. Durch das Konservieren mit gesättigter Kochsalzlösung konnten wir Zellpräparate bis zu 7 Monaten verwendbar erhalten[3]).

Für die einzelnen Versuche verwendeten wir jene Zellmenge, die in einem Kubikzentimeter des gut durchgeschüttelten Vorratsflascheninhaltes enthalten war. In zwei schmale, etwa 4 ccm

[1]) Wien. klin. Wochenschr. **23**, 10. 1910; diese Zeitschr. **26**, 312. 1910.

[2]) Das Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung kann natürlich auch an der mit entsprechend verminderter Geschwindigkeit laufenden Zentrifuge erfolgen.

[3]) Wir haben unter zahlreichen Versuchen mit die Zellen für unsere Reaktion nicht schädigenden Konservierungsmitteln gesättigte Kochsalzlösung als das geeignetste gefunden.

Digitized by Google

fassende, sterilisierte Eprouvetten wurde je 1 ccm dieser Suspension von Carcinomzellen in gesättigter Kochsalzlösung eingetragen und mit so viel physiologischer Kochsalzlösung versetzt, daß die Eprouvetten bis einige Millimeter unterhalb des Randes gefüllt waren. Dann wurde der Eprouvetteninhalt durchgeschüttelt, ungefähr 10 Minuten stehengelassen, zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgegossen und neuerlich durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt. Diese Prozeduren wurden viermal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugieren wurde die Waschflüssigkeit möglichst vollständig durch Abtropfenlassen aus den Eprouvetten entfernt und hierauf zu den Zellen in die eine Eprouvette 1 ccm 0,85 proz. Kochsalzlösung, in die zweite Eprouvette 1 ccm Serum zugefügt. Eine dritte Eprouvette wurde nur mit 1 ccm Serum beschickt. Dann wurden die drei Eprouvetten mit gut schließenden Kautschukstopfen verschlossen, durchgeschüttelt, zum Ausgleiche osmotischer Unterschiede etwa 15 Minuten stehengelassen und hierauf zentrifugiert. Aus den Seris bzw. aus der klaren Kochsalzlösung wurden einige Tropfen mit frisch ausgezogenen Glascapillaren zur refraktometrischen Bestimmung entnommen.

Der Eprouvetteninhalt wurde dann gut durchgeschüttelt und in den zur Vermeidung von Verdunstung mit Kautschukstopfen luftdicht abgeschlossenen Eprouvetten durch 24 Stunden bei 20 bis 22° gehalten. Nach Ablauf dieser Zeit wurde zentrifugiert und die Ablesung im Refraktometer in der gleichen Weise wieder vorgenommen. Anfangs- und Endablesung wurden bei derselben Temperatur ausgeführt. Aus den im Refraktometer abgelesenen Skalenteilen läßt sich der Brechungsindex mit Hilfe von Tabellen leicht berechnen. Wir verzichteten jedoch darauf, diese Umrechnung vorzunehmen, da es bei unseren Versuchen nur auf die Änderung des Brechungsvermögens ankommt und da es gleichgültig ist, ob diese Änderung in Hunderttausendsteln des Brechungsindexes oder in abgelesenen Skalenteilen ausgedrückt wird, die dem Brechungsindex annähernd direkt proportional sind.

Dieser Verzicht ermöglichte es, die Messungen statt bei 17,5°, auf welche die Anwendbarkeit der dem Refraktometer von den Zeisswerken beigegebenen Umrechnungstabellen beschränkt ist, bei einer beliebigen Temperatur auszuführen; wir

Digitized by Google

wählten als Ablesungstemperatur jeder Serie die bei der Erstablesung herrschende Zimmertemperatur. Die Konstanz der Temperatur während der Ablesung sicherten wir durch Einhängen des Refraktometers in eine etwa 10 l fassende Glaswanne. Dieses Wasserbad war mit Rührer versehen; seine Temperatur wurde ständig mit einem in Zehntelgrade geteilten Thermometer kontrolliert und durch Zugießen von kaltem oder warmem Wasser konstant gehalten. Als Lichtquelle diente eine nahe vor die Glaswanne gestellte mattierte elektrische Glühlampe.

Die Glasteile des Refraktometers nehmen in weniger als 20 Minuten die Badtemperatur an. Die Ablesungen erfolgten gewöhnlich 20 Minuten nach dem Einhängen des Refraktometers in das Bad.

Bei jedem Versuche wurde die Änderung des Brechungsvermögens an den Reaktionssystemen: Serum, präparierte Carcinomzellen + physiologische Kochsalzlösung, Carcinomzellen + Serum, bestimmt. 24 derartige Ablesungen sind in der Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I.

Nr.	Reaktionssystem	Abgelesene Skalenteile		Ablesungsdifferenz	Durch Reaktionen zwischen Serum und Ca-Zellen bedingte Differenz
		bei Beginn der Versuche	24 h nach Beginn der Versuche		
1	Serum	59,20	59,20	0,00	
	Ca-Zellen + physiolog. NaCl-Lösung	19,00	19,00	0,00	
	Ca-Zellen + Serum	53,25	53,55	0,30	0,30
2	Serum	58,10	58,20	0,10	
	Ca-Zellen + physiolog. NaCl-Lösung	19,00	19,00	0,00	
	Ca-Zellen + Serum	53,50	53,95	0,45	0,35
3	Serum	54,20	54,30	0,10	
	Ca-Zellen + physiolog. NaCl-Lösung	18,30	18,40	0,10	
	Ca-Zellen + Serum	49,00	49,60	0,60	0,40
4	Serum	65,60	65,40	− 0,20	
	Ca-Zellen + physiolog. NaCl-Lösung	18,50	18,50	0,00	
	Ca-Zellen + Serum	60,80	61,20	0,40	0,60

Die Änderungen des Brechungsvermögens in den Reaktionssystemen: präparierte Carcinomzellen + physiologische Kochsalzlösung, und im Serum sind auf Reaktionen zurückzuführen, deren Aufklärung und tunlichst weitgehende Ausschaltung spä-

Digitized by Google

teren Arbeiten vorbehalten bleiben mußte. Wir setzten voraus, daß diese Nebenreaktionen das Brechungsvermögen des Reaktionssystems Serum + präparierte Carcinomzellen um den gleichen Wert wie in jenen Systemen beeinflussen, in denen ihre Wirksamkeit allein zur Messung gelangte[1]). Die in dem System Serum + präparierte Carcinomzellen ermittelte Änderung des Brechungsvermögens würde sich demnach aus den durch Nebenreaktionen bedingten, gesondert meßbaren Komponenten und aus einer auf die Reaktionen des Serums mit den Carcinomzellen zurückführbaren Komponente zusammensetzen. Um aus der experimentell bestimmten Gesamtänderung des Brechungsvermögens im System Serum + präparierte Carcinomzellen jenen Anteil zu ermitteln, der durch die Reaktionen zwischen dem Serum und den Carcinomzellen bedingt ist, muß man daher von der abgelesenen Gesamtänderung die durch Nebenreaktionen hervorgerufenen Änderungen algebraisch subtrahieren.

Die letzte Vertikalkolonne der Tabelle I enthält die derart berechneten Werte, die als Endresultat der mitgeteilten vier Versuche aufzufassen sind.

Versuche mit Seris carcinomfreier Individuen.

Die Sera carcinomfreier Individuen bewirken nach den Beobachtungen von E. Freund und G. Kaminer[2]) teilweise Auflösung, „Zerstörung" zugesetzter präparierter Carcinomzellen. Ein derartiges Serum müßte nach der Reaktion mit den zugesetzten Krebszellen mehr gelöste Stoffe enthalten als anfänglich, und sein Brechungsvermögen sollte hierdurch einen höheren Wert annehmen. Wir prüften dies an einer größeren Zahl von Seris. Es wurden in der eben beschriebenen Weise je eine Eprouvette mit dem Serum, eine zweite mit präparierten Carcinomzellen + physiologischer Kochsalzlösung und eine dritte mit präparierten Carcinomzellen + dem Serum beschickt und das Brechungsvermögen bei Versuchsbeginn und nach 24stündiger Reaktionsdauer bestimmt.

Wir suchten ursprünglich Bakterienwachstum während des

[1]) Für die Zulässigkeit dieser Voraussetzung, die sich vorläufig nur statistisch prüfen ließ, sprechen die Ergebnisse der in den Tabellen VI und VIII vereinigten Messungen.

[2]) Wien. klin. Wochenschr. **23**, 10. 1910; diese Zeitschr. **26**, 312. 1910.

Digitized by Google

Versuches, von dem wir Störungen befürchteten, durch Zusatz von Thymol hintanzuhalten. Pregl[1]) gibt an, daß Zusatz kleinster Mengen von Thymol zum Serum dessen Brechungsvermögen kaum beeinflußt. Wir beobachteten jedoch, daß selbst ein kleiner Krystallsplitter Thymol sich in physiologischer Kochsalzlösung innerhalb von 24 Stunden bei Zimmertemperatur in refraktometrisch nachweisbarer Menge auflöst. Die betreffenden Messungen sind in Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle II.

Nr.	Reaktionssystem	Abgelesene Skalenteile		Differenz in Skalenteilen ausgedrückt
		beim Zufügen des Thymols	24 h nach d. Zufügen d. Thymols	
5	1 ccm physiolog. Kochsalzlösung + 1 Krystallsplitter Thymol	18,55	18,75	0,20
6	„	18,60	18,75	0,15
7	„	18,65	18,85	0,20
8	„	18,65	19,00	0,35
9	„	19,20	19,35	0,15
10	„	19,15	19,40	0,25
11	„	19,08	19,30	0,22
12	„	19,35	19,50	0,15
13	„	19,30	19,50	0,20
14	„	19,30	19,45	0,15

Ebenso steigt bei Thymolzusatz zu Serum dessen Brechungsvermögen infolge der allmählichen Auflösung des Desinfektionsmittels. Größere Mengen von Thymol verursachen überdies deutliche Trübungen des Serums. Wir setzten daher bei den späteren Versuchen jedem Kubikzentimeter Reaktionsflüssigkeit zwei Tropfen einer 5 proz. wässerigen Carbollösung als Desinficiens zu, da bei Verwendung eines bereits gelösten Desinfektionsmittels jene Fehlerquellen wegfallen, die durch allmähliche Auflösung eines zugesetzten festen Desinfektionsmittels, z. B. des Thymols, bedingt würden.

Die Ergebnisse von 13 Versuchen, die mit Series carcinomfreier Individuen in der früher beschriebenen Weise unter Anwendung von Phenol als Desinficiens ausgeführt wurden, sind in der Tabelle III zusammengestellt. Zur Vereinfachung der Tabelle sind nicht die Einzelablesungen, wie in der Tabelle I, sondern nur die Differenzen zwischen Anfangs- und Endablesung, also

[1]) Fermentforschung **1**, 7—12. 1914.

Digitized by Google

lediglich die durch Reaktionen bedingten Änderungen des Brechungsvermögens, angeführt.

Tabelle III.

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	In Hundertstelskalenteilen ausgedrückte Differenz zwischen Anfang- und Endablesung bei			Durch Reaktionen zwischen dem Serum und den Carcinomzellen bedingte Änderung des Brechungsvermögens in Hundertstelskalenteilen ausgedrückt
				Serum	Carcinomzellen + physiolog. Kochsalzlösung	Carcinomzellen + Serum	
15	46	♂	Typhus	20	30	60	10
16	45		Pneumonie	5	40	70	25
17	18	♂	Lues	0	−15	10	25
18	18	♂	Ulcus molle	−45	5	−10	30
19	25	♀	Lues	0	−20	20	40
20	19	♀	Kohlenoxydverg.	0	− 5	35	40
21	24	♂	Lues	−10	25	60	45
22	40	♂	Lues	− 5	30	75	50
23	32	♂	Lues	−40	0	10	50
24	36	♂	Dysenterie	− 5	15	60	50
25	50	♀	Ulcus ventric.	−50	10	30	70
26	34	♀	Lues	−10	−20	50	80
27	30	♂	Lues	−60	10	60	110

Wie aus den Zahlen hervorgeht, die in der letzten Vertikalkolonne der Tabelle III vereinigt sind, nimmt das Brechungsvermögen der Sera Nichtcarcinomatöser durch die Reaktion mit präparierten Carcinomzellen höhere Werte an.

Die Anwendung von zwei Tropfen 5proz. Carbollösung als ein Desinficiens, wie dies bei den in Tabelle III vereinigten Versuchen geschah, verursacht zunächst beim Zusatz des Phenols zum Serum eine minimale Trübung, die jedoch die Ablesung im Refraktometer nicht stört. Bei der Mehrzahl der Versuche verstärkte sich diese Trübung während der 24stündigen Reaktionsdauer nur unmerklich, bei einzelnen Versuchen war aber die Trübung nach Ablauf von 24 Stunden recht deutlich.

Wir entschlossen uns daher, auf die Verwendung von Desinfektionsmitteln überhaupt zu verzichten. Da wir, wenn auch nicht mit allen Kautelen, doch im wesentlichen steril arbeiteten, war bei keinem der ohne Desinfektionsmittel durchgeführten Versuchen ein deutliches Bakterienwachstum nachweisbar, das die Versuchsresultate etwa hätte stören können.

Die Änderungen im Brechungsvermögen der physiologischen

Digitized by Google

Kochsalzlösungen, Vertikalkolonne 6 der Tabelle III, die wohl auf Nebenreaktionen der Carcinomzellen zurückzuführen sind, weisen bei den einzelnen Versuchen verschiedene Werte auf, trotzdem hierbei annähernd gleiche Mengen gleichartigen Materials verwendet wurden. Es erschien uns daher notwendig festzustellen, ob gleichzeitig dem Zellvorrate entnommene, annähernd gleich große Zellmengen gleiche Änderungen des Brechungsvermögens der zugesetzten physiologischen Kochsalzlösung bewirken. Nur in diesem Falle ist es zulässig, von der im Reaktionssystem Serum + präparierte Carcinomzellen abgelesenen Änderung des Brechungsvermögens, Kolonne 7 der Tabelle III, die durch Nebenreaktionen in den Carcinomzellen bewirkten Änderungen Kolonne 6 der Tabelle III zu subtrahieren, um derart jene Änderung des Brechungsvermögens zu berechnen, welche durch die Reaktionen zwischen dem Serum und den präparierten Carcinomzellen bewirkt wird.

Es wurden daher in Abständen von mehreren Tagen je vier Eprouvetten in der gewohnten Weise mit Carcinomzellen und physiologischer Kochsalzlösung beschickt und das Brechungsvermögen der Natriumchloridlösung nach dem Zusammenbringen mit den Zellen und nach 24stündiger Einwirkungsdauer bestimmt. Die an 10 Versuchsserien ermittelten Änderungen des Brechungsvermögens sind in Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV.

Nr.	Reaktionssystem	In Hundertstelskalenteilen ausgedrückte Differenzen zwischen den Anfangs- und Endablesungen des Brechungsvermögens bei den gleichzeitig vorgenommenen Parallelversuchen.			
		1	2	3	4
28	1 ccm physiolog. Kochsalzlösung + präparierte Carcinomzellen	24	22	25	24
29	„	20	22	18	20
30	„	40	39	42	40
31	„	−5	−5	−5	−4
32	„	10	11	10	12
33	„	0	0	0	0
34	„	−5	−5	−5	−
35	„	15	15	15	15
36	„	0	0	−5	0
37	„	10	12	10	10

Die bei den Parallelversuchen jeder einzelnen Serie ermittelten Änderungen des Brechungsvermögens zeigen innerhalb der Ab-

Digitized by Google

lesungsfehler gleiche Werte, trotzdem diese Änderungen zwischen den einzelnen Serien beträchtliche Differenzen aufweisen. Es erscheint daher zulässig, bei der Ermittlung jener Änderung des Brechungsvermögens, welche durch die Reaktionen zwischen Serum und Carcinomzellen verursacht wird, von der abgelesenen Gesamtänderung dieses Reaktionssystems jenen Wert zu subtrahieren, um den sich das Brechungsvermögen des gleichzeitig aufgestellten Reaktionssystems präparierte Carcinomzellen + physiologische Kochsalzlösung geändert hat.

Es wurden bisher Versuche mit Seris von 50 carcinomfreien nicht fiebernden Individuen ohne Anwendung eines Desinfektionsmittels durchgeführt. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle V vereinigt.

Von den 50 untersuchten Seris zeigen demnach 47 eine durch die Reaktion mit den präparierten Carcinomzellen bedingte Erhöhung des Brechungsvermögens.

Nach dieser Statistik wäre es bei den Seris fieberfreier Nichtcarcinomatöser zulässig, aus der ermittelten Erhöhung des Brechungsvermögens auf die von E. Freund und G. Kaminer entdeckte „Zerstörung" präparierter Carcinomzellen durch das Serum in ähnlicher Weise zu schließen, wie dies bei der Freund-Kaminerschen Zerstörungsreaktion aus der Zählung der mikroskopisch noch intakt aussehenden Krebszellen geschieht.

Bei den in Tabelle V vereinigten Versuchen an Seris fieberfreier Nichtcarcinomatöser entspricht dem Teil der experimentell bestimmten Gesamtänderung des Brechungsvermögens, welchen wir als Resultat der Reaktion zwischen Serum und den Carcinomzellen ermitteln, eine Erhöhung des Brechungsvermögens. Im Gegensatz hierzu wurde bei den Seris carcinomfreier, jedoch fiebernder Individuen für diese Komponente der Gesamtänderung eine Abnahme des Brechungsvermögens ermittelt. Auch E. Freund und G. Kaminer[1]) haben bei ihrer Reaktion anormales Verhalten von Seris fiebernder Patienten beobachtet. Sie fanden jedoch, daß solche Sera gewöhnlich stärkeres Zerstörungsvermögen gegen Carcinomzellen zeigen, derart, daß das Serum fiebernder Carcinomkranker manchmal ähnlich stark zerstörte wie das Serum carcinomfreier Individuen. Die von uns an den

[1]) Wien. klin. Wochenschr. **26**, H. 51.

Digitized by Google

Tabelle V.

Nummer	Alter	Geschlecht	Diagnose	In Hundertstelskalenteilen ausgedrückte Differenz zwischen Anfangs- und Endablesung bei			Durch Reaktionen zwischen dem Serum und den Carcinomzellen bedingte Änderung des Brechungsvermögens in Hundertstelskalenteilen ausgedrückt
				Serum	Carcinomzellen + physiolog. Kochsalzlsg.	Carcinomzellen + Serum	
38	28	♀	Pleuritis	−10	0	−5	5
39	26	♀	Lues	0	20	25	5
40	34	♀	Abortus	5	0	10	5
41	16	♂	Balanitis	−10	27	22	5
42	46	♂	Ulcus recti	−30	30	5	5
43	65	♀	Arteriosklerose	0	5	10	5
44	61	♂	Arteriosklerose	−10	20	20	10
45	35	♀	Lues latens.	−30	15	−5	10
46	58	♀	Tbc. peritonei	−5	20	25	10
47	20	♀	Magenkartarrh	15	0	30	15
48	45	♀	Cholelithiasis	−20	0	−5	15
49	26	♀	Partus	−15	0	0	15
50	25	♂	Lues	−20	5	0	15
51	57	♀	Nephritis	10	5	30	15
52	26	♀	Lues	0	25	45	20
53	60	♀	Arteriosklerose	0	10	30	20
54	25	♂	Lues latens	0	20	40	20
55	50	♀	Cirrhos. hepat.	5	15	40	20
56	25	♂	Lues	−15	−20	−10	25
57	35	♂	Lues	−10	5	20	25
58	55	♀	Ulcus recti	−25	20	25	30
59	30	♀	Abortus	−15	0	15	30
60	23	♂	Lues	0	0	30	30
61	36	♀	Lues	0	0	30	30
62	28	♂	Lues	10	0	40	30
63	31	♀	Nephritis	5	15	50	30
64	29	♀	Lues	−25	20	30	35
65	26	♂	Lues	−25	20	30	35
66	27	♀	Lues	10	0	45	35
67	33	♂	Lues	−15	30	50	35
68	23	♂	Balanitis	−40	15	10	35
69	26	♀	Lues	10	10	60	40
70	23	♂	Lues	−20	25	45	40
71	27	♀	Partus	−20	0	20	40
72	58	♀	Cholelithiasis	−25	55	70	40
73	21	♂	Lues latens	−30	15	30	45
74	30	♂	Apicitis	−25	55	75	45
75	54	♀	Anaem. pernic.	−100	−5	−55	50
76	46	♀	Lymphosarcoma	−35	10	25	50
77	57	♀	Endothelioma cut.	−15	45	85	55
78	24	♂	Lues	−20	0	40	60
79	54	♀	Ulcus ventric.	−70	0	−10	60
80	25	♂	Lues	−75	30	20	65
81	23	♀	Magenkatarrh	−5	0	65	70
82	69	♂	Myeloma	−30	0	40	70
83	22	♀	Lues	−65	−20	−10	75
84	30	♂	Lues	−20	0	60	80
85			Encephalomalacia	0	20	20	0
86			Ulcus recti	0	−10	−15	−5
87	78	♂	Fractura fem.	5	15	0	−20

Digitized by Google

Seris carcinomfreier, fiebernder Patienten ermittelten Werte lassen wohl auch den Unterschied zwischen dem Serum carcinomfreier und carcinomkranker Personen verwischt erscheinen (vgl. die Versuche in Tabelle VI mit Tabelle VII), aber im umgekehrten Sinne, wie dies bei der Freund-Kaminerschen Reaktion zutage tritt. Dieser Unterschied läßt eine nähere Untersuchung der bei den Seris Fiebernder auftretenden Nebenreaktionen sowie weitere Vergleiche der refraktometrischen Untersuchungsweise mit der Freund-Kaminerschen Zählmethode wünschenswert erscheinen. Für letzteres wären jene Gebiete besonders geeignet, auf die sich die Untersuchungen über Beziehungen zwischen Thymus und Carcinom erstreckten, welche der eine von uns vor einiger Zeit in Gemeinschaft mit G. Kaminer[1]) ausführte.

Die Ergebnisse von 15 Versuchen, die bisher mit Seris fiebernder Nichtcarcinomatöser ausgeführt wurden, sind in Tabelle VII vereinigt.

Tabelle VI.

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	In Hundertstelskalenteilen ausgedrückte Differenz zwischen Anfangs- und Endablesung beim			Durch Reaktionen zwischen dem Serum und den Carcinomzellen bedingte Änderung des Brechungsvermögens in Hundertstelskalenteilen ausgedrückt
				Serum	Carcinomzellen + physiolog. Kochsalzlösung	Carcinomzellen + Serum	
88	33	♀	Sepsis	0	0	0	0
89	44	♀	Sepsis	−20	20	0	0
90	46	♂	Tbc. pulm.	20	20	25	− 5
91	31	♀	Sepsis	0	35	25	−10
92	29	♀	Typhus	−20	20	−10	−10
93	18	♀	Typhus	20	20	25	−15
94	22	♀	Sepsis	−10	25	0	−15
95			Tbc. pulm.	10	25	10	−25
96	40	♀	Typhus	30	15	20	−25
97	38	♂	Pneumonia	5	25	5	−25
98	19	♂	Pneumonia	20	16	10	−26
99	40	♀	Ty. exanth.	30	15	15	−30
100	17	♀	Ty. exanth.	− 5	45	5	−35
101	59	♀	Anaem. pernic.	15	20	−10	−45
102	40	♂	Ty. exanth.	5	0	20	15

14 von den 15 untersuchten Seris fiebernder carcinomfreier Patienten zeigen demnach unter unseren Versuchsbedingungen im Gegensatze zu den Seris

[1]) G. Kaminer und O. Morgenstern, Wien. klin. Wochenschr. **30**, H. 2. 1917; Diese Zeitschr. **84**, 281. 1917.

Digitized by Google

fieberfreier Nichtcarcinomatöser eine Abnahme des Brechungsvermögens.

Ein Vergleich der in Tabelle VI und in Tabelle VII vereinigten Versuchsdaten zeigt, daß das Brechungsvermögen von Seris fiebernder Nichtcarcinomatöser und von Seris fieberfreier Carcinomatöser durch die Reaktion mit präparierten Carcinomzellen analoge Änderungen erfährt. Wir vermuten, daß die Ursache dieses gleichartigen Verhaltens in den bei beiden Fällen vorliegenden anormalen Eiweißabbauprodukten zu suchen ist. Spätere Untersuchungen hierüber sind geplant.

Versuche mit Seris Carcinomkranker.

Mit den Seris von Carcinomkranken zusammengebrachte präparierte Carcinomzellen werden, wie E. Freund und G. Kaminer[1]) zeigten, durch die Einwirkung des Serums nicht zerstört. Ferner konnte der eine von uns in Gemeinschaft mit G. Kaminer[2]) nachweisen, daß sich zwischen dem Serum Carcinomatöser und präparierten Krebszellen eine ziemlich rasch verlaufende Reaktion abspielt, welche die Zerstörbarkeit der Carcinomzellen durch Thymusextrakte wesentlich herabsetzt. Solche Zellen erscheinen unter dem Mikroskope etwas schärfer konturiert als das Ausgangsmaterial, so daß die relativ rasch verlaufende Reaktion zwischen Carcinomserum und Carcinomzellen vielleicht als Fällung von in dem Serum gelösten Stoffen auf die Zelloberfläche gedeutet werden darf.

Bei unserer Versuchsanordnung sollte dem Unverändertbleiben der dem Carcinomserum zugefügten Krebszellen, wie es E. Freund und G. Kaminer beobachtet haben, Konstanz des Brechungsvermögens entsprechen. Die von dem einen von uns in Gemeinschaft mit G. Kaminer nachgewiesene Reaktion zwischen Carcinomserum und Carcinomzellen sollte, wofern ihre Deutung als Fällungsreaktion zutreffend ist, eine Abnahme des Brechungsvermögens bewirken. Wir prüften die Richtigkeit dieser Überlegungen bisher an 38 Seris von Patienten, bei denen durch Probeexcision oder bei der nachträglichen Obduktion Carcinom sichergestellt wurde.

Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle VII vereinigt.

[1]) Wien. klin. Wochenschr. **23**, 10. 1910.

[2]) G. Kaminer und O. Morgenstern, Diese Zeitschr. **84**, 314ff. 1917.

Digitized by Google

Tabelle VII.

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	In Hundertstelskalenteilen ausgedrückte Differenz zwischen Anfangs- und Endablesung bei			Durch Reaktionen zwischen dem Serum und den Carcinomzellen bedingte Änderung des Brechungsvermögens in Hundertstelskalenteilen ausgedrückt
				Serum	Carcinomzellen + physiolog. Kochsalzlösung	Carcinomzellen + Serum	
103		♂	Ca ventriculi	0	0	0	0
104	62	♂	oesophagi	−10	10	0	0
105	63	♀	recti	10	0	10	0
106	62	♀	duct. choled.	10	20	30	0
107	41	♀	ventriculi	−10	20	10	0
108	54	♀	tracheae	−25	15	−10	0
109	47	♀	uteri	−15	5	−10	0
110	47	♂	oesophagi	35	0	35	0
111	54	♀	ventriculi	5	20	20	−5
112	62	♀	colli	20	5	20	−5
113	45	♀	ventriculi	−25	20	−10	−5
114	52	♂	vesic. felleae	10	−10	−10	−10
115	54	♂	recti	−10	0	−20	−10
116	62	♂	recti	10	0	0	−10
117	61	♂	pancreatis	0	20	10	−10
118	56	♀	mammae	10	15	15	−10
119	47	♂	oesophagi	0	10	0	−10
120	49	♂	recti	10	20	10	−20
121	51	♂	parotidis	−5	30	0	−25
122	56	♀	ventriculi	0	25	0	−25
123	47	♀	ventriculi	25	10	10	−25
124	53	♂	recti	10	27	10	−27
125	49	♀	pharyngis	−63	88	−5	−30
126	47	♀	ventriculi	5	15	−10	−30
127	55	♂	linguae	5	35	10	−30
128	62	♂	ventriculi	−15	20	−25	−30
129	60	♂	penis	15	0	−20	−35
130	60	♂	penis	15	25	5	−35
131	61	♀	urethrae	10	20	−5	−35
132		♂	recti	0	40	5	−35
133	56	♀	ventriculi	15	25	5	−35
134	52	♀	cutis	30	20	10	−40
135	63	♂	ventriculi	0	30	−10	−40
136	55	♀	ventriculi	17	30	5	−42
137	70	♀	uteri	5	20	−20	−45
138	63	♀	recti	−20	100	5	−75
139	55	♀	mammae	40	20	−20	−80
140	46	♀	faciei	−15	0	30	45
141	Dieselbe während der Radiumbehandlung			−140	0	25	165

Digitized by Google

Von den 38 untersuchten Carcinomseris zeigen demnach 37 Sera nach der Reaktion mit den präparierten Krebszellen Konstanz oder Abnahme des Brechungsvermögens.

Bei dem aus der Reihe fallenden Versuche Nr. 140 handelt es sich um einen anscheinend wenig bösartigen Tumor, der laut Anamnese bereits 15 Jahre besteht. Die Patientin wurde in unserem Spitale mit Radium bestrahlt. Ihr während der Radiumkur entnommenes Serum zeigte nach der Reaktion mit präparierten Carcinomzellen eine Erhöhung des Brechungsvermögens um 165 Hundertstelskalenteile gegen 45 Hundertstelskalenteile vor der Bestrahlung (Versuch Nr. 141).

E. Freund und G. Kaminer[1]) haben beobachtet, daß bei radikal operierten Carcinomkranken einige Zeit nach der Operation ein Zerstörungsvermögen des Serums gegen Carcinomzellen wieder nachweisbar wird. Wir untersuchten bisher Sera von zwei radikal operierten Carcinomkranken (Versuch Nr. 142 und Nr. 143) und konnten in Analogie zu den Beobachtungen von E. Freund und G. Kaminer feststellen, daß das Brechungsvermögen der Operiertensera durch die Reaktion mit präparierten Carcinomzellen erhöht wurde. Ferner konnten wir in einem Falle das Serum eines Patienten vor (Versuch Nr. 144) sowie einen Monat nach der Operation (Versuch Nr. 145] untersuchen und ermitteln, daß das Brechungsvermögen des Operiertenserums durch die Reaktion mit den präparierten Krebszellen erhöht wurde, während das Brechungsvermögen des Serums des Patienten vor der Operation durch die gleiche Reaktion sank. In die Tabelle VIII ist auch ein Versuch (Nr. 146) eingereiht, der mit dem Serum einer an Zungenkrebs erkrankten Patientin ausgeführt wurde, bei welcher sich die Geschwüre durch einjährige Röntgenbehandlung gereinigt hatten.

Ursprünglich wurde auch bei den Carcinomseris mit zwei Tropfen 5proz. Carbollösung pro Kubikzentimeter Reaktionsflüssigkeit als Desinficiens gearbeitet. Es zeigten sich hierbei die gleichen Störungen, die beim Zusatz von Carbol zum Serum Nichtcarcinomatöser auftraten.

[1]) Wien. klin. Wochenschr. **24**, Nr. 51. 1911; vgl. G. Kaminer und O. Morgenstern, Diese Zeitschr. **84**, 311ff. 1917.

Digitized by Google

Tabelle VIII.

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	In Hundertstelskalenteilen ausgedrückte Differenz zwischen Anfangs- und Endablesung bei			Durch Reaktionen zwischen dem Serum und den Carcinomzellen bedingte Änderung des Brechungsvermögens in Hundertstelskalenteilen ausgedrückt
				Serum	Carcinomzellen + physiolog. Kochsalzlösung	Carcinomzellen + Serum	
142	55	♂	Ca recti vor 5 Jahren operiert, bei Sektion kein Ca.	−10	5	10	15
143	34	♀	Ca uteri vor 4 Jahren operiert	−50	−5	0	55
144	54	♂	Ca recti	−10	0	−20	−10
145	Derselbe, 1 Monat nach der Operation			−20	15	15	20
146	75	♀	Ca linguae	−70	15	−15	40

Versuche mit Leberzellen.

Ein Vergleich der in Tabelle V vereinigten Versuche mit jenen, welche in Tabelle VII zusammengestellt sind, zeigt, daß sich ein Unterschied im Verhalten des Serums Nichtcarcinomatöser und Carcinomatöser gegen präparierte Krebszellen refraktometrisch nachweisen läßt. Es war nun unter anderem zu untersuchen, ob es sich hierbei um eine, nur mit Carcinomzellen eintretende Reaktion handle, oder ob sich ein ähnlicher Unterschied im Verhalten carcinomatöser und nichtcarcinomatöser Sera auch gegenüber anderen Zellarten nachweisen lasse. Wir stellten daher isolierte Leberzellen in der gleichen Weise wie die Carcinomzellen her und brachten sie mit Seris carcinomfreier und carcinomkranker Individuen zur Reaktion. Kontrollversuche, Messungen und die Berechnung der durch die Reaktionen zwischen Serum und Leberzellen bedingten Änderung des Brechungsvermögens wurden wie bei den früheren Versuchen durchgeführt. Bisher wurden von uns 2 Sera fiebernder carcinomfreier Patienten, 6 Sera fieberfreier carcinomfreier Patienten und 5 Sera Carcinomkranker mit Leberzellen zur Reaktion gebracht. Die einzelnen Messungen sind in der Tabelle IX zusammengestellt.

Der Unterschied, der sich im Verhalten von Serum carcinomfreier und carcinomkranker Individuen gegen Krebszellen zeigt, ist demnach im Verhalten dieser beiden Sera gegen Leberzellen nicht nachweisbar.

Digitized by Google

Tabelle IX.

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	In Hundertstelskalenteilen ausgedrückte Differenz zwischen Anfangs- und Endablesung beim			Durch Reaktionen zwischen dem Serum und den Leberzellen bedingte Änderung des Brechungsvermögens in Hundertstelskalenteilen ausgedrückt
				Serum	Leberzellen + physiolog. Kochsalzlösung	Leberzellen + Serum	
147	64	♀	Typhus	− 5	−5	−40	−30
148	42	♂	Typhus	−20	20	−50	−50
149	33	♀	Hämorrhoiden	−25	25	−60	−60
150	32	♀	Fissura ani	10	20	−25	−55
151	18	♀	Gonorrhöe	−15	24	−50	−59
152	57	♀	Endotheliom	−15	10	−30	−25
153	30	♂	Apicitis	−25	5	−43	−23
154	58	♀	Cholelithiasis	−25	5	−43	−23
			Carcinomkranke				
155	47	♀	Ca mammae	−17	13	− 5	− 1
156	53	♂	Ca ventriculi	−30	25	−55	−50
157	53	♂	Ca ventriculi	−10	5	−10	− 5
158	62	♂	Ca ventriculi	−15	10	−25	−20
159	70	♂	Ca ventriculi	−10	30	10	−10

Die Ausdehnung der Untersuchung auf die Reaktionen von Serum mit verschiedenen anderen Zell- und Gewebsarten, besonders mit solchen, die normalerweise im Körper nicht vorkommen, deren Aufbau- oder Abbauprodukte demnach nur in bestimmten Fällen im Serum vorhanden sind, war vorgesehen. Das gleichartige Sinken des Brechungsvermögens von Ca-Serum (Abbauprodukte von Ca-Gewebe enthaltend) bei der Reaktion mit Krebszellen (Tabelle VII) und von Serum Ca-freier sowie Ca-Kranker (Abbauprodukte von Lebergewebe enthaltend) bei der Reaktion mit Leberzellen (Tabelle IX), ließ eine Untersuchung etwaiger Zusammenhänge zwischen dem Vorhandensein von Aufbau- bzw. Abbauprodukten der Gewebskomponente und dem Sinken des Brechungsvermögens bei unserer Reaktion erwünscht erscheinen. Ebenso sollte das Verhalten verschiedener Sera gegen das Gewebe jener Organe untersucht werden, die bei den einzelnen Patienten jeweils erkrankt waren.

Versuche mit inaktivierten Seris.

De Crinis und Pregl[1]) haben gezeigt, daß sich der Brechungsindex des Serums Carcinomatöser durch Reaktion mit koaguliertem Carcinomprotein erhöht, während der Brechungsindex des

[1]) Fermentforschung **1**, 1914.

Digitized by Google

Serums Carcinomfreier bei der gleichen Reaktion unverändert bleibt. Umgekehrt erhöht sich bei unseren Versuchen durch die Reaktion mit den nicht koagulierten Krebszellen gerade das Brechungsvermögen des carcinomfreien Serums, während das Brechungsvermögen des Serums Carcinomatöser unverändert bleibt oder eine Verminderung erfährt. Die Koagulation der Gewebskomponente im Reaktionssystem Serum + Carcinommaterial bewirkt demnach für die refraktometrische Untersuchungsmethode Umkehrung des Reaktionseffektes, also den gleichen Unterschied, welcher zwischen der Abderhaldenschen und der Freund-Kaminerschen Reaktion rücksichtlich des Abbaus des Ca-Materials besteht[1]). Wir versprachen uns von dem Auffinden von Zwischenstufen zwischen dem Preglschen und unserem Reaktionstypus näheren Einblick in den Reaktionsmechanismus selbst und untersuchten zunächst die Reaktion von bei 56° inaktivierten Seris mit unseren präparierten Krebszellen. In den folgenden Tabellen sind die Messungen, welche mit inaktiviertem Serum ausgeführt wurden, den Messungen mit dem gleichen, nicht inaktiviertem Serum zur Seite gestellt.

Die Tabelle X enthält die Messungen, welche mit Seris carcinomfreier, nichtfiebernder Patienten ausgeführt wurden. In 23 von den untersuchten 32 Fällen entspricht der Erhöhung des Brechungsvermögens bei der Reaktion des nicht inaktivierten Serums ein Sinken des Brechungsvermögens bei der Reaktion desselben jedoch inaktivierten Serums.

In die folgende Tabelle XI sind die Daten eingereiht, welche bei den Versuchen ermittelt wurden, die wir mit Seris carcinomfreier fiebernder Patienten ausführten.

Bei diesen Versuchen zeigt die durch die Reaktion mit den Ca-Zellen bedingte Änderung des Brechungsvermögens beim nicht inaktivierten und beim inaktivierten Serum das gleiche Vorzeichen und im großen ganzen auch die gleichen Zahlenwerte.

In der Tabelle XII sind die mit Seris Carcinomkranker ausgeführten Messungen zusammengestellt.

Bei 11 von den 22 ausgeführten Versuchen der Tabelle XII geht, ähnlich wie bei den Seris nichtfiebernder Carcinomfreier, mit dem Inaktivieren eine Umkehrung der durch die Reaktion mit den Carcinomzellen bedingten Änderung des Brechungsvermögens parallel.

[1]) Wien. klin. Wochenschr. 1913, Nr. 8. Protokoll d. Ges. d. Ärzte.

Digitized by Google

Tabelle X.

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	In Hundertstelskalenteilen ausgedrückte Differenz zwischen Anfangs- und Endablesung bei					Durch Reaktionen zwischen dem Serum und den Carcinomzellen bedingte Änderung des Brechungsvermögens in Hundertstelskalenteilen ausgedrückt beim	
				Serum	inakt. Serum	Carcinomzellen + physiolog. Kochsalzlösung	Carcinomzellen + Serum	Carcinomzellen + inakt. Serum	Serum	inakt. Serum
160	25	♂	Lues	−75	−25	30	20	5	65	0
161	35	♂	Lues	−30	25	15	−5	20	10	−20
162	26	♀	Lues	0	0	20	25	−30	5	−50
163	26	♀	Lues	10	10	10	60	−10	40	−10
164	23	♂	Lues	−20	0	25	45	15	40	−10
165	61	♂	Arteriosklerose	−10	0	20	20	−30	10	−50
166	57	♀	Ulc. ventriculi	−25	5	20	25	−10	30	−35
167	26	♂	Lues	−25	0	20	30	−5	35	−25
168	29	♀	Lues	−25	10	20	30	−15	35	−45
169	16	♂	Balanitis	−50	0	27	22	0	5	−27
170	46	♂	Ulc. ventriculi	−30	0	30	5	10	5	−20
171	58	♀	Tbc. peritonei	−5	5	20	25	25	10	0
172	65	♀	Arteriosklerose	0	10	5	10	10	5	−5
173	61	♀	Arteriosklerose	20	10	15	40	−5	5	−30
174	69	♂	Nephritis	−20	0	15	10	−25	15	−10
175	57	♀	Endotheliom	−15	−5	45	85	−5	55	−45
176	46	♀	Lymphosarkom	−35	−10	10	25	−5	50	−5
177	58	♀	Cholelithiasis	−25	5	55	70	10	40	−50
178	54	♀	Anaemia pernic.	−100	60	−5	−55	−30	50	−85
179	65	♂	Cirrhosis hep.	−25	20	10	10	15	25	−15
180	53	♀	Nephritis	−5	−20	5	25	−25	25	−10
181	21	♂	Gesund	−25	35	10	5	20	20	−25
182	30	♂	Apicitis	−25	−5	55	75	10	45	−40
183	21	♂	Lues	−30	−20	15	30	35	45	40
184	26	♀	Lues	0	−30	25	45	15	20	20
185	45	♀	Ikterus	−20	−40	0	−5	10	15	45
186	30	♀	Abortus	−15	−15	0	15	30	30	45
187	52	♂	Nephritis	−5	−15	0	15	15	10	30
188	26	♀	Partus	−15	−5	0	0	15	15	20
189	27	♀	Partus	−20	−20	0	20	10	40	30
190	21	♀	Polycythämie	10	−20	0	20	30	10	50
191	25	♂	Lues	−50	−60	15	5	20	40	65

Wir führten auch Versuche mit präparierten Leberzellen in derselben Weise aus wie die in den Tabellen X—XII angeführten Versuche mit präparierten Carcinomzellen. In der Tabelle XIII sind die Daten zusammengestellt, die bei 2 Seris fiebernder und bei 6 Seris nichtfiebernder carcinomfreier Patienten ermittelt wurden, ferner die Daten von 5 Versuchen mit Seris nichtfiebernder Carcinomatöser. Die Leberzellen sind in der früher beschriebenen Weise präpariert.

Digitized by Google

Tabelle XI.

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	In Hundertsteilskalenteilen ausgedrückte Differenz zwischen Anfangs- und Endablesung beim					Durch Reaktionen zwischen dem Serum und den Carcinomzellen bedingte Änderung des Brechungsvermögens in Hundertsteilskalenteilen ausgedrückt beim	
				Serum	inakt. Serum	Carcinomzellen + physiolog. Kochsalzlösung	Carcinomzellen + Serum	Carcinomzellen + inakt. Serum	Serum	inakt. Serum
192	19	♂	Grippe	20	−20	16	10	−19	−26	−15
193	22	♀	Typh. exanth.	30	20	15	15	10	−30	−25
194	17	♀	Typh. exanth.	−5	10	45	5	15	−35	−40
195	37	♂	Tbc. pulmon.	10	5	25	10	0	−25	−30
196	31	♀	Sepsis	0	10	35	25	0	−10	−45
197	40	♀	Typhus	30	10	15	20	0	−25	−25
198	18	♀	Typhus	20	30	20	25	30	−15	−20
199	38	♂	Pneumonia	5	−10	25	5	−5	−25	−20
200	22	♀	Sepsis	−10	−10	25	0	0	−15	−15
201	40	♀	Typh. exanth.	5	5	0	20	20	15	15

Tabelle XII.

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	In Hundertsteilskalenteilen ausgedrückte Differenz zwischen Anfangs- und Endablesung bei					Durch Reaktionen zwischen dem Serum und den Carcinomzellen bedingte Änderung des Brechungsvermögens in Hundertsteilskalenteilen ausgedrückt beim	
				Serum	inakt. Serum	Carcinomzellen + physiolog. Kochsalzlösung	Carcinomzellen + Serum	Carcinomzellen + inakt. Serum	Serum	inakt. Serum
202	63	♀	Ca recti	−20	0	100	5	130	−75	30
203	49	♀	pharyngis	−63	−65	88	−5	30	−30	7
204	70	♀	uteri	5	−15	20	−20	0	−45	5
205	61	♂	pancreatis	0	0	20	10	30	−10	10
206	54	♂	tracheae	−25	−5	15	−10	25	0	15
207	55	♀	mammae	40	−30	20	−20	0	−80	10
208	56	♀	mammae	10	0	15	15	15	−10	0
209	47	♀	ventriculi	5	−15	15	−10	15	−30	10
210	57	♀	uteri	−15	−10	5	−10	0	0	5
211	47	♀	ventriculi	25	−5	10	5	10	−25	45
212	47	♂	oesophagi	0	−35	10	0	10	−10	35
213	41	♀	ventriculi	−10	10	20	30	−40	0	−70
214	55	♀	ventriculi	17	5	30	5	−10	−42	−45
215	61	♀	urethrae	10	5	20	−5	10	−35	−35
216	63	♂	ventriculi	0	0	30	−10	0	−40	−30
217	45	♂	ventriculi	−25	0	20	−10	−30	−5	−50
218	51	♂	cutis	−5	15	30	0	10	−25	−35
219	53	♂	recti	10	−10	27	10	5	−27	−12
220	73	♂	recti	0	0	40	5	−10	−35	−50
221	56	♂	ventriculi	15	0	25	5	10	−35	−15
222	55	♂	linguae	5	60	35	10	40	−30	−55
223	62	♂	ventriculi	−15	−10	20	−25	−35	−30	−45

Digitized by Google

Tabelle XIII.

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	In Hundertstelskalenteilen ausgedrückte Differenz zwischen Anfangs- und Endablesung bei					Durch Reaktionen zwischen dem Serum und den Leberzellen bedingte Änderung des Brechungsvermögens in Hundertstelskalenteilen ausgedrückt beim	
				Serum	inakt. Serum	Leberzellen + physiolog. Kochsalzlösung	Leberzellen + Serum	Leberzellen + inakt. Serum	Serum	inakt. Serum
224	64	♀	Typhus	− 5	10	−5	−40	0	−30	− 5
225	42	♂	Typhus	−20	− 5	20	−50	−40	−50	−55
226	33	♀	Hämorrhoiden	−25	−45	25	−60	−55	−60	−35
227	32	♀	Fistula ani	10	60	20	−25	0	−55	−80
228	28	♀	Gonorrhöe	−15	−40	24	−50	−80	−59	−64
229	57	♀	Endotheliom	−15	− 5	40	−30	−20	−25	−25
230	30	♂	Apicitis	−25	− 5	5	−43	− 5	−23	− 5
231	58	♀	Cholelithiasis	−25	5	5	−43	−20	−23	−30
232	47	♀	Ca mammae	−17	0	17	− 1	−35	− 1	−52
233	53	♂	Ca ventric.	−30	−30	25	−55	−50	−50	−45
234	53	♂	Ca ventric.	−10	−15	5	−10	−35	− 5	−25
235	62	♂	Ca ventric.	−15	−10	10	−25	−45	−20	−45
236	70	♂	Ca ventric.	−10	25	30	10	0	−10	−55

Zusammenfassung.

1. Bei 47 von 50 untersuchten Seris nichtfiebernder carcinomfreier Individuen trat durch die Reaktion mit präparierten Carcinomzellen eine Erhöhung des Brechungsvermögens des Serums ein.

2. Bei 37 von 38 untersuchten Seris nichtfiebernder Carcinomkranker blieb das Brechungsvermögen des Serums durch die Reaktion mit präparierten Carcinomzellen unverändert oder erfuhr eine Verminderung.

3. Die von E. Freund und G. Kaminer entdeckten Reaktionen zwischen Serum und Carcinomzellen lassen sich demnach auch refraktometrisch nachweisen.

4. Bei 14 von 15 untersuchten Seris fiebernder carcinomfreier Individuen sank das Brechungsvermögen des Serums durch die Reaktion mit präparierten Carcinomzellen.

5. Bei den bisher untersuchten 2 Seris fiebernder und 5 Seris nichtfiebernder carcinomfreier Individuen sowie bei den 5 bisher untersuchten Seris nichtfiebernder carcinomkranker Individuen sank das Brechungsvermögen des Serums durch die Reaktion mit präparierten Leberzellen.

Digitized by Google

Spezifische Serumreaktionen mit einfach zusammengesetzten Substanzen von bekannter Konstitution (organischen Säuren).[1])

XIV. Mitteilung über Antigene und serologische Spezifität.

Von

Karl Landsteiner.

(R. K. Ziekenhuis. Den Haag.)

(Eingegangen am 24. Januar 1920.)

In der vorhergehenden Mitteilung[2]) wurde vorläufig über Versuche berichtet, denen, wie ich kurz wiederhole, folgender Sachverhalt zugrunde liegt.

Es wurden durch Injektion von Azoproteinen, d. i. mit Diazokörpern gekuppelten Eiweißstoffen, Immunseren[3]) hergestellt. Solche Seren haben die Eigenschaft, alle jene Azoproteine zu präcipitieren, die die gleiche Azokomponente enthalten, wie das Immunisierungsantigen, gleichgültig, welcher Eiweißkörper zur Kuppelung genommen wurde. Diese Regel ist so lange richtig, als es sich um gewöhnliche, unzerlegte Eiweißstoffe handelt. Bei Azoalbumosen (aus Witte-Pepton) war die Präcipitation geringer und bei gekuppeltem Seidenpepton oder Tyrosin fand eine Fällung durch Serum nicht mehr statt.

Da die erwähnten Immunseren spezifisch auf die Azokomponente einwirken, so war zu vermuten, daß sie auch mit den zuletzt genannten Substanzen in Reaktion treten, nur so, daß dabei eine Fällung nicht zustande kommt. Ich versuchte, diese Annahme mit Hilfe einer als spezifische Hemmungsreaktion bezeichneten Probe nachzuweisen, die darauf beruht, daß ein Überschuß von Antigen die Präcipitinreaktion abschwächt oder bei

[1]) Ausgeführt mit Unterstützung der Fürst-Liechtenstein-Spende.

[2]) Diese Zeitschr. **93**, 106. 1919.

[3]) Diese werden im folgenden nur mit dem Namen der Azokomponente bezeichnet.

Digitized by Google

genügender Konzentration ganz verhindert (Halban und Landsteiner[1])].

Die Erscheinung war auch bei den Reaktionen der Azoimmunseren deutlich wahrzunehmen[2]), besonders ausgesprochen bei den aus Pepton Witte dargestellten Prüfungsantigenen. Hier trat bei einem Antigengehalt der Stammlösung von 5% unter bestimmten Bedingungen eine Präcipitinreaktion bei einer Verdünnung des Antigens von 1 : 2500, aber nicht mehr bei 1 : 100 und 1 : 500 auf. Vermutlich beruht das Eintreten der Hemmung schon bei ziemlich geringer Konzentration in diesem Fall auf der geringeren Molekulargröße des Präparates, wodurch vermutlich einerseits die Fällungsreaktion überhaupt abgeschwächt wird, andererseits die für die Hemmung maßgebende molekulare Konzentration im Verhältnis zu gewöhnlichen Antigenen rascher erreicht wird.

Es wurde nun nachgesehen, ob nicht auch einfache Substanzen, die die gleiche Azokomponente enthalten, wie ein als Antigen verwendetes Azoprotein, die Fällung desselben verhindern, so wie wenn ein Überschuß des Antigens selbst angewendet worden wäre.

Die Versuchsanordnung bestand darin, daß zu einem durch das Serum fällbaren Antigen die auf ihre Reaktionsfähigkeit zu prüfenden Stoffe und dann Immunserum zugesetzt wurde. Blieb die zu erwartende Präcipitation aus oder wurde sie abgeschwächt, so war dadurch eine Reaktion der betreffenden Substanz nachgewiesen. Die gemachten Beobachtungen werden im folgenden beschrieben.

Zunächst wurden die Versuche mit einer Anzahl von Kupplungsprodukten aus Tyrosin und m-Oxybenzoesäure und einzelnen Azokörpern aus Salicylsäure ausgeführt. Als Antigene kamen Azoproteine aus Hühnerserum zur Verwendung, die als Azokomponenten m-Aminobenzolsulfosäure (Metanilsäure) und p-Aminophenylarsinsäure (p-Arsanilsäure) enthielten. Die Immunseren waren durch Injektion von Kaninchen mit Azoprotein aus Pferdeserum hergestellt[3]).

Zur Darstellung der Kupplungsprodukte wurde in folgender Weise verfahren[4]). Von Tyrosin wurden 0,09 g, von m-Oxybenzoesäure

[1]) Münch. med. Wochenschr. 1902, Nr. 12. Liter. in der vorhergehenden Mitt. l. c.

[2]) l. c. S. 111.

[3]) Vgl. Diese Zeitschr. 86, 343. 1918.

[4]) Über die Reindarstellung solcher Verbindungen s. Pauly, Zeitschr. f. physiol. Chemie 94, 284. 1915.

Digitized by Google

0,069 g (je $^1/_2$ Molek.) genommen, von den zur Diazotierung benützten Aminosäuren die einem Molekül entsprechenden Mengen. Die angegebenen Mengen von Tyrosin bzw. m-Oxybenzoesäure wurden mit 10 ccm Normalnatriumcarbonatlösung versetzt, die Diazolösungen[1]) zugefügt und die Gemische eine Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das anfänglich suspendierte Tyrosin geht unter Umrühren bald in Lösung. Dann wurden die Lösungen mit ziemlich starker Salzsäure sauer gemacht (Kongo)[2]), gegen Lackmuspapier neutralisiert und auf ein bestimmtes Volumen (Stammlösung) gebracht. Das Volumen wurde so bemessen, daß die Lösung aus Tyrosin + p-Arsanilsäure $^1/_2$% Farbstoff enthielt, zu welchem Zweck sie auf Grund der Annahme, daß der Azokörper mit einem Molekulargewicht von 637 quantitativ sich bildet, mit Wasser auf 63,7 ccm gebracht wurde. Die anderen Lösungen wurden mit dieser den Molekulargewichten entsprechend äquivalent gemacht, wieder unter der Annahme, daß entsprechend der Arbeit von Pauly[3]) zwei Moleküle der Diazokörper mit einem Molekül der Oxysäuren zusammentreten.

Zu den Serumproben[4]) wurde für jedes Röhrchen 0,2 ccm der Antigene aus Hühnerserum in der Verdünnung 1 : 500 genommen und 0,1 ccm einer mit 1 proz. NaCl-Lösung hergestellten vierfachen Verdünnung der Stammlösungen der Azofarbstoffe zugefügt (in die Kontrollprobe kam 0,1 ccm NaCl-Lösung), dann die dem Antigen entsprechenden Immunseren, und zwar vom Immunserum Metanilsäure 3, p-Arsanilsäure 2, Toluidinsulfosäure (2,5) 3 Capillartropfen (Tropfengröße ungefähr 0,04 ccm). Eines der Immunseren, das durch die längere Aufbewahrung leicht getrübt war, ließ sich durch Filtrieren durch Kieselgur enthaltende Papierfilter (Macherey, Nagel & Co., Düren Nr. 660) leicht vollständig klären.

Die Ablesung erfolgte nach einstündigem Stehen im Zimmer. Eine zweite nach längerem Stehen im Eisraum gemachte Ablesung bot keinen Vorteil und wird deshalb nicht wiedergegeben.

In der Tabelle ist die Stärke der Fällung durch die Zeichen $\pm$, +, $+\pm$, ++, $++\pm$, +++, $+++\pm$, ++++ ausgedrückt; $\pm$ bedeutet eine sehr schwache Trübung, ++++ eine starke Fällung; − bedeutet, daß die Probe vollständig klar blieb. Wenn an einer Stelle kein Zeichen steht, wurde die betreffende Probe nicht angestellt. Von den Lösungen der Azofarbstoffe gab eine, die durch Mißfarbigkeit auffiel, nämlich die Kombination m-Xylidinsulfosäure + m-Oxybenzoesäure bei allen Immunseren deutliche, aber nicht sehr starke Hemmungen. Die Substanz wurde deshalb nicht weiter verwendet.

---

[1]) Über die Darstellungen s. l. c. Diese Zeitschr. **86**, S. 355ff.

[2]) Beim Ansäuern entstand nur bei einem Teil der Substanzen, nämlich o-Brom-o-toluidin-p-sulfosäure, p-Aminobenzoesäure, 2-Amino-p-toluylsäure, p-Arsanilsäure ein Niederschlag, und zwar bei der Kombination mit allen drei Oxysäuren.

[3]) l. c.

[4]) Über die Einzelheiten der Versuchsanordnung s. l. c. Diese Zeitschr. **86**, 343.

Digitized by Google

Tabelle I. Azokörper.

Antigene und Immunseren	Metanilsäure			p-Arsanilsäure			Toluidinsulfosäure (2,5)		
Azokörper	Tyrosin	m-Oxybenzoesäure	Salicylsäure	Tyrosin	m-Oxybenzoesäure	Salicylsäure	Tyrosin	m-Oxybenzoesäure	Salicylsäure
o-Aminobenzoesäure	+++	+++		+++	+++		+++	+++	
2-Amino-p-toluylsäure	+++	+++		+++	+++		+++	+++	
p-Aminobenzoesäure	+++	+++		+++	+++		+++	+++	
Metanilsäure	−	−	±	+++	+++	+++	+	+	+
m-Xylidinsulfosäure	+++			+++			+++		
p-Brom-m-aminobenzolsulfosäure	+++	+++		+++	+++		+++	+++	
p-Aminobenzolsulfosäure	+++	+++		+++	+++		±	±	
o-Brom-o-toluidin-p-sulfosäure	+++	+++		+++	+++		−	−	
p-Arsanilsäure	+++	+++	+++	−	−	−	+++	+++	+++
Kontrolle		++±			++±			++±	

Aus den Versuchen, die in der Tabelle verzeichnet sind, geht hervor, daß mit diazotierter Metanilsäure, p-Arsanilsäure, Toluidinsulfosäure gekuppeltes Tyrosin, m-Oxybenzoesäure und Salicylsäure die Präcipitinreaktionen der entsprechenden Azoproteine vollständig oder bis auf Spuren aufheben und daß diese Hemmung ohne Zweifel eine spezifische ist. Die Spezifizität dürfte in ganz ähnlicher oder gleicher Weise ausgebildet sein, wie bei den Präcipitinreaktionen der Azoproteine selbst. Das zeigen die Proben mit dem Immunserum Toluidinsulfosäure (2,5). Während die beiden anderen Seren nach den früheren Ergebnissen der Präcipitinproben[1]) unter den geprüften Substanzen nur bei den homologen Substanzen, nämlich den Kombinationen mit Metanilsäure bzw. p-Arsanilsäure Reaktionen erwarten ließen, sollte das genannte Serum Verwandtschaftsreaktionen geben, und zwar bei o-Brom-o-toluidin-p-sulfosäure, p-Aminobenzolsulfosäure und schwächer bei Metanilsäure[2]). Dem entspricht das erhaltene Resultat, und der Grad der Hemmungen

[1]) l. c. Diese Zeitschr. **86**, 343, Tabelle I.

[2]) Die Kupplungsprodukte mit Toluidinsulfosäure (2,5) selbst wurden nicht dargestellt.

Digitized by Google

geht der Intensität der früher angestellten Präcipitinreaktionen ungefähr parallel.

Es ist noch zu bemerken, daß die verwendeten Azokörper nicht nur die Präcipitation hemmen, sondern daß man mit ihrer Hilfe auch die schon gebildeten Niederschläge nach Abzentrifugieren und Waschen derselben wieder auflösen kann. Die Wirkung scheint nach einigen Versuchen geringer zu sein, als bei dem anderen Verfahren, die Spezifizität wohl die gleiche.

Die nächstliegende Erklärung für die geschilderten Erscheinungen und zugleich die Auffassung, die die Versuche veranlaßte, ist folgende. Die hemmenden Substanzen enthalten eine Gruppe, die mit der spezifischen Gruppe des entsprechenden Azoproteins, mit der das verwendete Immunserum reagiert, identisch ist. Man kann deshalb annehmen, daß sich auch die Hemmungskörper mit den Antikörpern des Immunserums verbinden und diese dadurch verhindern, auf das in der Lösung vorhandene Azoprotein einzuwirken und es zu fällen. Dabei wird sich ein je nach den relativen Mengen von Antigen und Hemmungskörper wechselnder Gleichgewichtszustand einstellen.

Dieser Annahme zufolge stellen die beschriebenen Reaktionen einen prinzipiell neuen Befund dar, nämlich spezifische Serumreaktionen mit synthetisch dargestellten Substanzen bekannter Beschaffenheit. Angaben über Immunisierungen mit chemisch reinen Stoffen bekannter Konstitution, über Serumreaktionen und besonders anaphylaktische Reaktionen mit solchen Substanzen wurden allerdings öfters gemacht, aber, soviel mir bekannt ist, wurde in keinem einzigen Fall ein entscheidender oder auch nur ein Wahrscheinlichkeitsbeweis zustande gebracht[1]). Auch die vorliegenden Versuche sprechen übrigens nicht dafür, daß sich solche Reaktionen mit den gewöhnlichen Methoden erzielen lassen, und in der vorhergehenden Mitteilung wurde[2]) gezeigt, daß stark abgebautes Protein, wie es im Seidenpepton vorliegt, keine Präcipitinreaktion mit Immunserum gab. Die kolloide Beschaffenheit der Prüfungsantigene ist also, wie schon gesagt wurde[2]), nach den bisher vorliegenden Kenntnissen zwar für die

[1]) Vgl. z. B. Doerr, Handb. v. Kolle-Wassermann **2**, 1005ff. Ergebn. d. Immunitätsf., herausgeg. von Weichardt **1**, 261. Volk, Arch. f. Dermatol. u. Syphilis **109**, 163.

[2]) l. c.

Digitized by Google

serologischen Fällungsreaktionen, nicht aber für die spezifischen Beziehungen zum Immunserum notwendig.

Die Spezifität des Hemmungsphänomens wäre auch durch die Annahme zu verstehen, daß die Hemmungskörper mit der spezifischen Gruppe nicht des Antikörpers, sondern des Antigens (vor oder vielleicht nach dessen Verbindung mit dem Antikörper) in Reaktion treten. Wie ich schon früher erwähnte, sind keine Tatsachen bekannt, die diese Ansicht zu stützen geeignet wären. Die zuerst angeführte entspricht hingegen der Erklärung, die von allen Autoren für die im Wesen wahrscheinlich übereinstimmende Hemmung durch hohe Antigenkonzentrationen akzeptiert wird[1]). Man nimmt hier an, daß das Präcipitin, wenn es sich auf eine große Menge präcipitabler Substanz verteilt, mit dieser eine lösliche Verbindung bildet, so daß kein Niederschlag entsteht. Auf analogen Verhältnissen, nämlich einer Verteilung des Antikörpers auf viel Antigen beruht wahrscheinlich auch die Verringerung oder Aufhebung der Agglutination bei Anwesenheit einer großen Quantität von Blut oder Bakterien.

Wollte man für die hier beschriebenen Erscheinungen die andere Erklärung vorziehen, so müßte man neben der Wirkung der Immunseren noch eine zweite ebenso spezifische Reaktion zwischen Antigen und Hemmungskörper postulieren. Da bei der gedachten Reaktion kein Antikörper mitwirkt, so würde der Vorgang die künstliche Nachahmung einer spezifischen Immunreaktion bedeuten. Ein direkter Zusammenhang mit Serumreaktionen bestünde nur dann, wenn die elektive Wirkung der Antikörper darauf beruhen würde, daß sie direkte Derivate der Antigene sind und die gleiche spezifische Gruppe enthalten wie diese. Dann wäre, zwischen einer Reaktion der hemmenden Substanzen mit Antikörpern und Antigenen kein wesentlicher Unterschied mehr vorhanden.

Diese früher von Buchner und Metchnikoff vertretene Hypothese[2]) über die Antikörper wurde neuerdings in verschiedenen Formen wieder befürwortet [Herzfeld und Klinger[3]), Liebermann[4]) vgl. Lange[5])], allerdings ohne daß neue experimentelle Ergebnisse angeführt worden wären. Der wichtigste Einwand, der dieser Gruppe von Hypothesen vorläufig gegenübersteht, ist wohl der, daß sie die elektive Wirkung der normalen Antikörper und der Pflanzenagglutinine unerklärt lassen und so zwei ganz verschiedene Erklärungsprinzipe für anscheinend nahe verwandte Erscheinungen erfordern.

---

[1]) Lit. in der zit. Mitt. Diese Zeitschr. **93**; s. auch Arrhenius, Immunochemie S. 189 und die dort zitierten Arbeiten von Hamburger, Fol. haemat. **2**, Nr. 8, 1905; Hamburger und Arrhenius, Proc. of the meet. of the Roy. Ac. of Sc. in Amsterdam 26. V. 1906, S. 33; ferner Arrhenius in Asher-Spiro, Ergebn. d. Physiol. **7**, 480, 1908.

[2]) Vgl. Müller, Vorles. über Inf. u. Immun., 2. Auflage, S. 168. 1909.

[3]) Diese Zeitschr. **85**, 1. 1918.

[4]) Diese Zeitschr. **91**, 46. 1918.

[5]) Diese Zeitschr. **95**, 83. 1919.

Digitized by Google

Die zuerst angeführte Auffassung der Hemmungsreaktionen halte ich nach dem Gesagten für bedeutend wahrscheinlicher. Es ist zu hoffen, daß sich eine direkte experimentelle Entscheidung in der Folge geben lassen wird.

Für die Auffassung der hier mitgeteilten Versuche ist aber vorläufig die Frage von nicht sehr großer Bedeutung, weil es sich in jedem Fall um ein Reagieren der einfach konstituierten Hemmungskörper mit den für die Serumreaktionen maßgebenden spezifischen Gruppen handeln muß.

Die beschriebenen mit Azofarbstoffen erhaltenen Ergebnisse führten naturgemäß dazu, noch einfacher zusammengesetzte Substanzen in der gleichen Weise zu untersuchen, und zwar zuerst die den Immunseren entsprechenden Azokomponenten.

Die ersten Proben wurden mit neutralen Lösungen von m-amidobenzolsulfosaurem und p-amidophenylarsinsaurem Natrium angestellt und ergaben die Tatsache einer elektiven hemmenden Wirkung dieser beiden Substanzen.

Versuchsanordnung wie oben. Von den zu prüfenden Lösungen wurde wieder 0,1 ccm genommen. Sie enthielten 1% Metanilsäure (Kahlbaum) bzw. 2% Atoxyl.

	Antigene und Immunseren	
	Metanilsäure	p-Arsanilsäure
Metanilsäure	−	+++
p-Arsanilsäure	+±	−
Kontrolle	++	+++

Der folgende Versuch diente dazu, die Wirkung der Azokörper und der Aminosäuren quantitativ zu vergleichen.

Versuchsanordnung wie oben.

Die geprüften Substanzen waren Azokörper aus Tyrosin kombiniert mit Metanilsäure und p-Arsanilsäure, dann reine Metanilsäure und p-Arsanilsäure. Den Farbstoff aus Tyrosin und p-Arsanilsäure stellte ich nach den Angaben von Pauly[1]) rein dar, nur mit der Abweichung, daß ich mehr Normal-NaOH, nämlich bis zur deutlich alkalischen Phenolphthaleinreaktion bei der Kupplung zufügte. Von der Substanz wurde eine neutrale Stammlösung gemacht, die $^1/_{100}$ Grammolekül im Liter = 0,637 g in 100 ccm enthielt. Die äquivalente Lösung des Azokörpers aus Tyrosin und Metanilsäure wurde hergestellt ohne den Farbstoff auszufällen (s. o.) und enthielt der Rechnung nach 0,549 g in 100 ccm. Metanilsäure und p-Arsanilsäure wurden, wie im vorigen Versuch als Natriumsalze angewendet.

In bezug auf äquimolekualre Mengen ist also die Wirkung der Azofarbstoffe beträchtlich stärker, als die der einfachen

[1]) l. c.

Digitized by Google

	Antigen u. Immunserum Metanilsäure					Antigen u. Immunserum p-Arsanilsäure			
Molare Konzentration	400	1200	3600	10800		400	1200	3600	10800
Tyrosin komb. mit Metanilsäure	−	±	+	++	Tyrosin komb. mit p-Arsanilsäure	−	±	+	++
Molare Konzentration	10	30	90	270		10	30	90	270
Metanilsäure	−	−	+	+±	p-Arsanilsäure	−	−	+	++
Kontrolle	+++±				Kontrolle	+++			

Aminosäuren. Immerhin wirken diese noch bei ziemlich niedriger Konzentration, z. B. die Metanilsäure, da das Volumen der Proben ungefähr 0,4 ccm betrug, nach diesen und ähnlichen Versuchen unter den gewählten Versuchsbedingungen sicher noch bei einer Konzentration von 0,1—0,2%. Ohne Zweifel hängt dieser Wert auch von der Konzentration der übrigen Stoffe (Antigen, Antikörper) ab.

Nach diesen Feststellungen erschien es als die wichtigste Aufgabe, die Spezifizität der merkwürdigen Reaktionen und den Zusammenhang zwischen Hemmungseffekt und chemischer Konstitution an einer ziemlich großen Zahl von Substanzen zu untersuchen. Als solche wurden den Azokomponenten mehr oder weniger verwandte Stoffe, also verschiedenartige Aminosäuren und Carbon-, Sulfo- und Arsinsäuren (ohne Aminogruppen) zum Versuch genommen.

Die Ausführung der Proben war dieselbe wie bei den schon beschriebenen Versuchen, doch wurde von den Lösungen der zu prüfenden Körper nur 0,05 ccm für jede Probe genommen. Auch die Immunseren wurden mit einer capillaren Meßpipette abgemessen und je nach der Wirksamkeit des Serums 0,1—0,25 ccm genommen, so daß in der Kontrollprobe eine starke Reaktion eintrat. Schwach wirkende Seren waren nicht brauchbar. Die Lösungen wurden aus je $^1/_2$ Millimol[1]) der Substanzen[2]) (also z. B. von Metanilsäure 0,0865 g) in einem kleinen graduierten Zylinder mit Glasstopfen durch Verreiben mit einem Glasstab, ausnahmsweise durch Erwärmen hergestellt. Als Lösungsmittel diente 1proz. Kochsalzlösung. Zur Auflösung bzw. zur Neutralisation war in den meisten Fällen ein Zusatz

[1]) Bei einzelnen Versuchen, wo es besonders vermerkt ist, wurde die halbe Konzentration genommen.

[2]) Die meisten Präparate waren Handelspräparate von Kahlbaum, zum Teil mußten sie dargestellt werden (z. B. Arsinsäuren, Methoden bei Bertheim, Handb. d. organ. Arsenverbindungen. Enke, Stuttgart 1913).

Digitized by Google

von 0,5 ccm Normalnatronlauge oder bei mehrbasischen Säuren eine größere Menge nötig; immer wurden die Lösungen meist unter Verwendung von $^{n}/_{10}$-NaOH und $^{n}/_{10}$-HCl gegen empfindliches Lackmuspapier genau neutral gemacht und zum Schluß mit 1 proz. NaCl-Lösung auf ein Volumen von 5 ccm aufgefüllt. Bei mehreren, in flüssiger Form verwendeten Säuren wurden die Lösungen durch Titration hergestellt. Einige Substanzen wurden als Natriumsalze (Berücksichtigung eines evtl. Wassergehaltes) und Chloride (Histidin, Lysin) gewogen.

In den fertigen Proben war nach dem Gesagten die Konzentration der geprüften Substanzen $^{1}/_{70}$-normal (bzw.-molek.) oder geringer, wenn größere Serummengen als 0,1 ccm gewonnen wurden.

Die Ablesung erfolgte wie oben nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur.

Ein störender Faktor, der aber auf die Resultate keinen irgendwie wesentlichen Einfluß hat, wurde erst im Laufe der Arbeit bemerkt. Es zeigte sich nämlich, daß eine Minderzahl der Substanzen mit den Immunseren (unspezifische) Niederschläge gab, ein Teil derselben während der Versuchsdauer nur eine geringe Spur von Trübung; manche Körper aber starke Trübungen, z. B. besonders ausgesprochen α-naphthalinsulfos. Na. Diese Erscheinung wurde bisher nicht bei normalen Kaninchenseren, die bei den Versuchen als Kontrolle verwendet wurden, und nicht bei einigen frischen Immunseren beobachtet, sondern nur bei längerer Zeit in zugeschmolzenen Glasröhren aufbewahrten Seren (aus dem Glas aufgenommene Stoffe?). Die Proben, bei denen dadurch ein irgendwie in Betracht kommender, aber nur kleiner Fehler entstanden sein kann, also eine etwas zu starke Reaktion angegeben sein dürfte, sind in der Tabelle mit dem Zeichen * versehen. War die Trübung so stark, daß ein beträchtlicher Fehler verursacht werden konnte, so ließen sich die Proben mit dem betreffenden Serum nicht ausführen. Zu den einzelnen Versuchen wurden gewöhnlich zehn Substanzen (aus verschiedenen Körperklassen) genommen, gleichzeitig mit mehreren Immunseren geprüft und dazu jedesmal eine neue Kontrollprobe (Antigen + Immunserum + 0,05 ccm NaCl-Lösung) gemacht. Da die Intensität der Fällung bei dem gleichen Antigen in den verschiedenen Versuchen nur wenig variierte (wenn nötig, wurde die Serummenge entsprechend geändert), so werden im folgenden, der besseren Übersicht halber, diese Versuche nicht einzeln angeführt, sondern die Proben nach der Beschaffenheit der geprüften Substanzen gruppiert. Sollten daraus kleine Ungenauigkeiten entstanden sein, so sind sie für die Folgerungen, die aus den Versuchen gezogen werden sollen, durchaus belanglos. Auch die Ablesung durch einfache Schätzung genügt für die Zwecke dieser Untersuchung. Bei einer Fortsetzung der Arbeit wird aber die Einführung einer exakteren Ablesungsmethode zu erwägen sein.

Außer mit den erwähnten Gruppen organischer Säuren wurden in gleicher Weise Proben mit einzelnen anorganischen Säuren angestellt. Sie sind noch zu spärlich, um irgendwelche Schlüsse zu ziehen und sind aus diesem Grunde nicht in die Tabelle aufgenommen worden. Von den Resultaten sei hier vorläufig nur erwähnt, daß schweflige Säure bei Metanil-

Digitized by Google

säure- und p-Arsanilsäureserum, besonders bei dem letzteren, eine starke Hemmung, Arsensäure schwächere Hemmungen gab. Schwefelsäure und natürlich auch Salzsäure (s. Kontrolle), ferner arsenige Säure waren ohne Wirkung.

Von Salzen organischer Basen wurde nur salzsaures Anilin und salzsaures Guanidin geprüft; sie zeigten keinen Einfluß auf die Präcipitation, ebensowenig Harnstoff und Glykose.

Tabelle II. Arsinsäuren.

Immunseren	p-Arsanilsäure	Metanilsäure	p-Aminobenzoesäure
Kontrolle	++++	++++	++++±
o-Arsanilsäure	−	+++±	
p-Arsanilsäure	−	++++±	++++±
o-Toluidinarsinsäure	−	++++±	
p-Toluidinarsinsäure	−	+++±	
3-Chlor-4-aminophenylarsinsäure	−	++++±	
3-Brom-4-aminophenylsäure	−	+++±	
3-Jod-4-aminophenylarsinsäure	−	++++±	
Dichlorarsanilsäure	−	++	
Dibromarsanilsäure	−	+±	
Dijodarsanilsäure	−	+++	
p-Nitranilinarsinsäure	−	++++±	
p-Acetarsanilsäure	−	++++±	
Methylarsinsäure	+++±	++++±	
Phenylarsinsäure	−	+++	
p-Oxyphenylarsinsäure	−	+++±	++++±
Phenetylarsinsäure	−	++++±	
Kakodylsäure	+++		

Ich beginne die Zusammenstellung der Ergebnisse mit den Arsinsäuren (Tabelle II), weil bei diesen die Verhältnisse am einfachsten liegen. Mit zwei Ausnahmen hemmen bei der angewendeten Konzentration alle überhaupt geprüften Arsinsäuren die Reaktion des p-Aminophenylarsinsäure I.-S.[1]) vollständig. Um Abstufungen zu finden wäre es nötig gewesen, geringere Konzentrationen zu nehmen, was bisher nicht geschehen ist. Die Ausnahmen bilden die Methylarsinsäure und die Kakodylsäure. Die Methylarsinsäure enthält, wie die aromatischen Arsinsäuren, den Rest $AsO(OH)_2$, und man muß daraus wohl den Schluß ziehen, daß das Fehlen des Benzolkernes bei dieser Substanz und bei der

[1]) I.-S. = Immunserum

Digitized by Google

Kakodylsäure das abweichende Verhalten bedingt[1]). Dieser Punkt ist sehr bemerkenswert und wäre durch Einführung verschiedenartiger Kohlenwasserstoffe näher zu untersuchen. Arsensäure selbst hemmt wohl, aber beträchtlich schwächer als die aromatischen Arsinsäuren. Auch bei dem Metanilsäure-I.-S. traten Hemmungen ein, die nur in einzelnen Fällen beträchtlich waren, im allgemeinen aber sehr weit hinter den Wirkungen auf das p-Arsanilsäure-I.-S. zurückblieben. Die Bedeutung solcher geringerer Hemmungen hier und bei später zu besprechenden Proben bleibt noch zu ermitteln. Bei den mit p-Aminobenzoesäure-I.-S. und einigen anderen Seren (s. u.) angestellten Proben gaben Arsinsäuren keine oder geringe Hemmungen.

Tabelle III. Sulfosäuren.

Immunseren	p-Arsanilsäure	Metanilsäure	p-Aminobenzoesäure
Kontrolle	++++	++++	+++±
o-Aminobenzolsulfosäure	+++±	−	+++±
Metanilsäure	++++	−	+++
p-Aminobenzolsulfosäure	+++±	++	+++±
p-Toluidinsulfosäure	++++	±	
m-Xylidinsulfosäure	++++	+±	
Toluidinsulfosäure (2,5)	+++±	−	
p-Chlor-o-aminobenzolsulfosäure	++++	−	
p-Brom-o-aminobenzolsulfosäure	++++*	+++*	
p-Brom-m-aminobenzolsulfosäure	++++*	++±*	+++
o-Brom-o-toluidin-p-sulfosäure		++	+++±
Dibromsulfanilsäure	++++*	+++*	
Nitranilinsulfosäure	++++	+	
Naphthionsäure	++++	±	
p-Aminophenolsulfosäure		+	
Äthylsulfosäure	++++	+++±	
Benzolsulfosäure	++++	±	+++±
p-Phenolsulfosäure		+	+++±
Kresol-o-sulfosäure		++	+++±
3-Nitrobenzolsulfosäure	++++*	++*	

[1]) Bemerkenswert ist der Parallelismus, der in der chemotherapeutischen Unwirksamkeit der Methylarsinsäure und Kakodylsäure besteht (Castelli, Arch. f. Schiffs- und Tropenhyg. **16**, 605. 1912), wie auch die alle aromatischen Arsinsäuren umfassende Hemmungswirkung an das gleichartige Verhalten der Spezifizität bei der Arsenfestigkeit der Trypanosomen erinnert.

Digitized by Google

Das Hauptergebnis der Versuche ist also die starke und spezifische Wirkung aller geprüften aromatischen Arsinsäuren auf das Arsinsäure-I.-S., so daß die Reaktion wohl zur Erkennung dieser Substanzen verwendbar wäre. Die Arsinsäuregruppe hat bei der Hemmungsreaktion eine ähnliche dominierende Bedeutung für die Spezifizität wie bei den früher untersuchten Reaktionen der Azoproteine[1]), nur daß die Reaktionsbreite noch vergrößert ist. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den noch zu besprechenden, so erkennt man sehr deutlich, daß unter den bindenden Gruppen (Receptoren) der Antigene große Unterschiede in bezug auf die Beeinflussung der Spezifizität bestehen, und möglicherweise erstrecken sich diese Differenzen auch auf die Fähigkeit zur Bildung von Antikörpern. Dafür spricht es, daß mit p-Arsanilsäure hergestelltes Antigen leichter Antikörperbildung bewirkte als andere Azoproteine[2]).

Bei der Prüfung einer Reihe von Sulfosäuren (zumeist Aminosulfosäuren) zeigten sich ganz ähnliche Erscheinungen wie die eben besprochenen (Tabelle III). Während die Präparate sich gegen p-Arsanilsäure-I.-S. und p-Aminobenzoesäure-I.-S. fast indifferent verhielten. wurde die Präcipitation durch Metanilsäure-I.-S., entsprechend der chemischen Ähnlichkeit der Substanzen und des dem Serum entsprechenden Antigens, in den meisten Fällen stark gehemmt, mehrmals ganz aufgehoben. In Übereinstimmung mit dem Verhalten der Methylarsinsäure war die aliphatische Äthylsulfosäure nicht wirksam. Eine Aminosulfosäure des Naphthalins (Naphthionsäure) hemmte stark.

Das Metanilsäure-I.-S. zeigt also die Sulfosäuregruppe in cyclischen Verbindungen an, womit nicht gesagt sein soll, daß das allgemein zutrifft. Wirklich bestehen im Gegensatz zu den mit Arsinsäuren gemachten Proben beträchtliche Unterschiede der Reaktion bei den einzelnen Substanzen, von denen in dem vorliegenden Material besonders die bromierten eine geringere Wirkung zu haben schienen. Um den Einfluß verschiedener Substituenten und, wenn möglich, deren Ursache festzustellen, ist ein eingehendes Studium nötig[3]).

Beim Vergleich mit den Reaktionen der Azosulfosäuren

[1]) l. c. S. 382, Tab. I.
[2]) l. c. S. 365.
[3]) Vgl. l. c., XII. Mitt. S. 386 u. 387.

Digitized by Google

(Tabelle I) und jenen der Azoproteine[1]) ist wieder zu sehen, wie die spezifische Wirkung auf eine bestimmte Substanz abgenommen, die Reaktionsbreite zugenommen hat. Dieses Verhalten ist leicht begreiflich, wenn man bedenkt, daß beim Übergang von den Azokörpern zu den jetzt untersuchten Substanzen eine Vereinfachung der Struktur eintritt, so daß Besonderheiten, die für die feine spezifische Einstellung maßgebend sind, wegfallen. Trotzdem ist eine solche Einstellung, wenn auch verwischt, im Versuchsprotokoll erkennbar und war noch deutlicher, als die Konzentration der Hemmungskörper verringert wurde. Schärfer ausgeprägt war die spezifische Wirkung auf eine einzelne Substanz bei anderen Immunseren, so bei m-Xylidinsulfosäure-I.-S. (Tabelle VII).

Tabelle IV.

Aliphatische (und verwandte) Säuren.

Immunseren	p-Arsanilsäure	Metanilsäure	p-Aminobenzoesäure
Kontrolle	++++	++++	+++±
Essigsäure	++++	++++	
Propionsäure	+++±	++++	++++
Isovaleriansäure	++++	++++	+++
Milchsäure	++++	++++	+++±
Lävulinsäure	++++	+++±	
Chloressigsäure	++++	++++	+++
Bromisocapronsäure		++++	++±
Cyanessigsäure		++++	
Weinsäure	++++	++++	+++±
Brenzweinsäure		+++±	+++±
Zuckersäure		++++	+++±
Citronensäure	+++±	+++±	+++±
α-Crotonsäure		+++±	+++±
Fumarsäure	++++	+++±	+++±
Camphersäure		++++	+++±
Glykokoll	++++	++++	+++±
d-Alanin		++++	+++±
Aminoisovaleriansäure		++++	+++±
Leucin	++++	++++	+++±
Asparaginsäure	+++±	++++	+++±
Glutaminsäure		++++	+++±
Lysin		++++	+++±

[1]) XII. Mitt., Tab. I.

Digitized by Google

Diese Erscheinung steht im Wesen allerdings den schon beschriebenen Präcipitinwirkungen bei Azoproteinen nahe Trotzdem ist die Tatsache so spezifischer Reaktionen auf einfache organische Substanzen überraschend und hat abgesehen von biochemischen Erscheinungen[1]) kaum Anologien in der Chemie, wenn man bedenkt, daß es sich nicht um vereinzelte Fälle, sondern offenbar um ein allgemeines Prinzip handelt.

In der Tabelle IV sind die Resultate angeführt, die erhalten wurden, als ich die Immunseren mit aliphatischen Carbonsäuren zusammenbrachte. Obzwar verschiedene Typen, und zwar einbasische, mehrbasische, gesättigte, ungesättigte, substituierte Säuren, gewählt wurden, trat in keinem Falle eine starke, meistens gar keine Hemmung ein. Diese Proben dienen gewissermaßen als Kontrolle für die anderen Versuche. Natürlich ist es möglich, daß bei fortgesetztem Suchen Körper zu finden sind, die sich anders verhalten, doch würde das an dem generellen Ergebnis nichts ändern.

Tabelle V verzeichnet die Proben mit aromatischen und einigen anderen cyclischen Carbonsäuren. Da die vorhandene Menge der Seren zu gering war, konnten nicht mit jedem Serum alle Proben angestellt und auch nicht so viele Präparate (und Immunseren) untersucht werden, als es erwünscht wäre. Die vorhandenen Resultate genügen aber schon zu einer Orientierung. Auch bei diesen Körpern sind, wie bei den bisher besprochenen Fällen, die Wirkungen sichtlich von der Konstitution abhängig, und wieder traten nur bei einem der Immunseren, nämlich dem p-Aminobenzoesäure-I.-S., mit dessen Antigen die Substanzen chemisch verwandt sind, vollständige oder starke Hemmungen auf. Die meist geringe Beeinflussung der anderen Seren, besonders des Metanilsäure-I.-S., sollen hier außer Betracht bleiben und nur die großen Ausschläge beachtet werden.

Die stark wirkenden Substanzen sind bei dem Serum gegen p-Aminobenzoesäure solche, die, wie das entsprechende Antigen, eine Carboxylgruppe am Benzolkern tragen. (Phenol war un-

[1]) Von ähnlichen Erscheinungen auf biologischem Gebiete wären Fermentwirkungen, in erster Linie die sehr spezifische Einstellung der von Bloch (Zeitschr. f. physiol Chem. 98, 226. 1916/17) beschriebenen auf 3, 4-Dioxyphenylalanin wirkenden Oxydase, auszuführen, wenn auch ein Unterschied darin besteht, daß Bloch keine Verwandtschaftsreaktionen mit anderen Substanzen beobachtete.

Digitized by Google

Tabelle V.

Aromatische und andere cyclische Säuren.

Immunseren	p-Arsanilsäure	Metanilsäure	p-Amino-benzoesäure
Kontrolle	++++	++++	+++±
o-Aminobenzoesäure	+++±	+++±	±±
m-Aminobenzoesäure	+++±	+++	−
p-Aminobenzoesäure	++++	+++	−
o-Aminozimtsäure			+∓
m-Aminozimtsäure	++++	++++	+
p-Aminozimtsäure			±
4-Brom-3-aminobenzoesäure			−
Hippursäure	++++	+++	+++±
Benzoylalanin		+++	+++±
Phenylalanin		++++	+++±
act. Prolin		++++	+++±
Histidin	+++±	±±	++±
Tryptophan		++++	+++±
Benzoesäure	++++	+++	−
m-Toluylsäure	++++	+++±	−
o-Oxybenzoesäure			++
m-Oxybenzoesäure		+++	±
p-Oxybenzoesäure	±+++	+++±	−
m-Chlorbenzoesäure			−
m-Brombenzoesäure			−
p-Brombenzoesäure			−
m-Nitrobenzoesäure			−
Phthalsäure		+++	+++
Terephthalsäure		++++	−
Anissäure	++++	++++	−
Äthylsalicylsäure	++++*	++++*	++±
Gentisinsäure		++++*	+++±
Vanillinsäure		+++±	+±
Cumarsäure			++±
Phenylessigsäure	++++	+++±	++±
Zimtsäure	±++++*	++++*	±
p-Nitrozimtsäure			−
Phenylpropiolsäure	++++*	++++*	++
Benzilsäure			+++±
α-Naphthoesäure			+±
Nicotinsäure		+++±	±
Brenzschleimsäure	++++	++++	++
Mekonsäure		±+++	+++

Digitized by Google

Tabelle VI.

Immunserum: p-Aminobenzoesäure.

Molekul. Konzentration der Substanzen $^1/_{20}$.

Kontrolle	++++±
o-Toluylsäure	+++±
m-Toluylsäure	+±
p-Toluylsäure	−
o-Brombenzoesäure	+++±
m-Brombenzoesäure	+
p-Brombenzoesäure	−
o-Nitrobenzoesäure	+++
m-Nitrobenzoesäure	+±
p-Nitrobenzoesäure	−
Phthalsäure	++++±
Isophthalsäure	+
Terephthalsäure	+

wirksam, p-Aminophenol gab eine Hemmung mittleren Grades.) Die Substanzen, bei denen Carboxyl in der Seitenkette steht, wirken zum Teil bedeutend schwächer oder gar nicht, wie Phenylessigsäure, Phenylpropiolsäure, Phenylalanin, während Zimtsäure und p-Nitrozimtsäure stark hemmten. Die Ersetzung des Benzolkernes durch andere Kerne (Naphthalin, Pyridin, Furan) und unter Umständen auch die Substitution im Benzolkern verminderten die Wirkung in verschiedenem Grade. Das Zusammentreffen mehrerer solcher Änderungen beeinträchtigte die Wirkung noch mehr [Tryptophan, Benzilsäure, Mekonsäure[1])]. Substanzen mit einem Benzoylrest (Hippursäure, Benzoylalaun) waren unwirksam.

Bei der Substitution von Wasserstoffatomen des Benzolkernes war das Resultat weit weniger von der Art der Substituenten (CH_2, Cl, Br, NO_2, COOH) abhängig als von ihrer Stellung. Die Carboxylgruppe hatte einen etwas größeren Einfluß als die anderen Substituenten. Da dieses Verhalten auffiel (Tabelle V, Oxysäuren, Aminozimtsäuren), wurde ein eigener Versuch mit verringerter Konzentration der zu prüfenden Körper angestellt (Tabelle VI). Ganz übereinstimmend zeigte sich eine Abnahme der Hemmung in der Reihenfolge para, meta, ortho. Diese auffallende Erscheinung deutet wieder auf den Einfluß der räumlichen An-

[1]) Eine besondere Stellung nahm das Histidin ein, das auch bei Metanilsäure-L-S. wirkte und auch bei einem gewöhnlichen Präcipitinserum (gegen Pferdeserum) ebenso wie Arginin eine allerdings nur geringe Hemmung oder Verzögerung der Fällung gab.

Digitized by Google

ordnung hin[1]), sei es vermöge einer Abstimmung des Serums auf Körper mit Parastellung oder im Sinne sterischer Hinderung. Eine Entscheidung wird wohl durch Untersuchung von Seren, die Antigenen mit anderer Stellung entsprechen, ohne Schwierigkeit zu erreichen sein.

Ob bei dem p-Aminobenzoesäure-I.-S. die homologe Substanz (p-Aminobenzoesäure) stärker wirkt als die anderen im Versuche vollständig hemmenden Carbonsäuren, konnte, weil zu wenig Serum zur Verfügung stand, noch nicht (durch Verminderung der Konzentration der Hemmungskörper) geprüft werden. Es scheint aber, als ob eine scharfe Einstellung auf bestimmte Substanzen eher bei etwas komplizierter gebauten Körpern, die sozusagen mehr Merkmale besitzen, möglich wäre. Darauf deuten außer dem schon hervorgehobenen Verhalten des m-Xylidinsulfosäure-I.-S. (Tabelle VII) auch einige Reaktionen hin, die mit einem Serum gegen m-Aminozimtsäure-I.-S. angestellt wurden (Tabelle IX). Die stärksten Hemmungen gaben hier die drei Aminozimtsäuren, unter denen die mit Metastellung bei späterer Ablesung etwas stärkere Wirkung zeigte als die anderen. Auf den deutlichen Unterschied in den Reaktionen dieses und des p-Aminobenzoesäure-I.-S. sei noch hingewiesen.

Die beschriebenen Versuche enthalten die Tatsache des Eingreifens ganz einfach konstituierter Substanzen in die bei den Serumreaktionen wirksamen spezifischen Gruppen, wobei offenbar — in Anbetracht der Notwendigkeit, überschüssige Mengen der Hemmungskörper zu verwenden — lockere, dissoziable Verbindungen gebildet werden. Die Mutmaßung, daß es sich um allgemeine (der Intensität nach wechselnde) Reaktionshemmungen handeln könne, die nichts mit den spezifischen Eigenschaften der Seren zu tun haben, läßt sich schon nach dem vorliegenden Material mit Sicherheit ausschließen. Unter Berücksichtigung der chemischen Beschaffenheit der verwendeten Substanzen sind die Erscheinungen, wie ich glaube, am ehesten durch die Annahme der Bildung von Salzen oder von Komplexverbindungen (Mole-

[1]) Vgl. XII. Mitt., S. 388. Beachtenswert ist die ähnliche Bedeutung der Substitution in bestimmter Stellung bei chemotherapeutischen Effekten (vgl. Weinberg, Ber. d. Deutsch chem. Ges. **49**, 1234, Morgenroth, Festschr. f. Ehrlich. G. Fischer,. Jena 1914, S. 553).

Digitized by Google

Tabelle VII.

Immunserum: m-Xylidinsulfosäure.

Mol. Konzentration	1/20	1/10	Mol. Konzentration	1/20	1/10
Kontrolle	++++	++++	Dibromsulfanilsäure	+++	
p-Arsanilsäure		+++±			
Dibromarsanilsäure		+++±	Nitranilinsulfosäure	++	
o-Aminobenzolsulfosäure	+++	+±	Naphthionsäure	++±	
			Äthylsulfosäure	++++	
Metanilsäure	+++	++	Benzolsulfosäure	+++	++
p-Aminobenzolsulfosäure	+++	++±	3-Nitrobenzolsulfosäure	++±	
p-Toluidinsulfosäure	+		Anthranilsäure		+++
			m-Aminobenzoesäure		+++±
m-Xylidinsulfosäure	−	−	p-Aminobenzoesäure		+++±
Toluidinsulfosäure (2,5)	+++	++	m-Aminozimtsäure		++++
p-Chlor-o-aminobenzolsulfosäure	+		Glykokoll		++++
			Propionsäure		++++
p-Brom-o-aminobenzolsulfosäure	++±*		Isovaleriansäure		+++±
			Hippursäure		++++
p-Brom-m-aminobenzolsulfosäure	++±		Brenzschleimsäure		++++
			m-Toluylsäure		+++
o-Brom-o-toluidin-p-sulfosäure	+		Anissäure		+++±
			Zimtsäure		++++*

Tabelle VIII.

Immunserum: o-Aminobenzolsulfosäure.

Kontrolle	+++	**Anthranilsäure**	+±
p-Arsanilsäure	+++	**m-Aminobenzoesäure**	++±
o-Aminobenzolsulfosäure	−	**p-Aminobenzoesäure**	++±
Metanilsäure	±	**m-Aminozimtsäure**	++±
p-Aminobenzolsulfosäure	+	**Propionsäure**	+++
p-Brom-o-aminobenzolsulfosäure	±	**m-Toluylsäure**	++
		Zimtsäure	++±

Digitized by Google

Tabelle IX.

Immunserum: m-Aminozimtsäure.

Kontrolle	++++	m-Aminozimtsäure	−
p-Arsanilsäure	+++	p-Aminozimtsäure	−
o-Aminobenzolsulfosäure	++±	Glykokoll	+++
		Leucin	+++
m-Aminobenzolsulfosäure	++±	Asparaginsäure	+++
		Propionsäure	+++
p-Aminobenzolsulfosäure	++±	Milchsäure	+++
		Hippursäure	++±
p-Brom-o-aminobenzolsulfosäure	++±	act. Prolin	+++
		Phenylalanin	±
Anthranilsäure	++	Histidin	++
m-Aminobenzoesäure	+	m-Toluylsäure	+
		m-Chlorbenzoesäure	+
p-Aminobenzoesäure	+		
		Phenylessigsäure	++
o-Aminozimtsäure	−	Zimtsäure	+

kularverbindungen) zu verstehen[1]). Weitere Aufklärungen werden vermutlich durch Variation der Immunseren und der Hemmungskörper zu erreichen sein, indem man auf diese Weise feststellt, welche Art von Gruppen zu den Reaktionen überhaupt befähigt sind.

Gegenüber den früher mitgeteilten, noch keineswegs abgeschlossenen Untersuchungen[2]) über serologische Spezifizität durch Einführung verschiedenartiger Gruppen in Eiweißkörper sind die Verhältnisse hier in theoretischer Beziehung nicht unwesentlich vereinfacht. Ein methodischer Vorteil liegt in der leichten Technik und der Möglichkeit, sehr zahlreiche Substanzen beliebiger Beschaffenheit zu prüfen, auch solche, die mit den zur Verfügung stehenden Verfahren mit Eiweiß nicht in Verbindung gebracht werden können.

Außer der ohne weiteres gegebenen Verwendbarkeit der hier beschriebenen Hemmungsreaktionen zum Studium der Affinität und spezifischen Wirkung der Immunstoffe ist vielleicht noch an eine Fortsetzung dieser Untersuchungen in anderer Richtung zu denken. Schon jetzt haben sich serologische Reaktionen, abgesehen von der Diagnose der Spezies, in einigen Fällen für die Chemie der Eiweißkörper verwenden lassen. So konnten sie be-

[1]) Werner, Neuere Anschauungen usw. Vieweg, Braunschweig 1913, S. 28; vgl. die in dieser Zeitschr. 86 393 zit. Arbeiten, ferner Wittka, Diss. Halle 1916.

[2]) X. Mitt. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 26, 258, XII. Mitt. l. c.

Digitized by Google

nutzt werden, um die Entstehung neuer Eiweißderivate anzuzeigen [Landsteiner[1])] und natürliche Eiweißkörper zu charakterisieren und auf ihre Reinheit zu prüfen [Osborne und Wakeman, Wells[2])]. Der Umstand, daß bei den Azoproteinen durch die Hemmungsreaktion die bindenden Gruppen gewissermaßen herausgeschält werden können, läßt es nicht unmöglich erscheinen, auf anologe Weise die für die Serumreaktionen maßgebenden Gruppen auch bei unveränderten Eiweißkörpern aufzusuchen und so Aufschlüsse über den Bau der Proteine und der Antigene überhaupt zu erhalten. Als Substrat für solche Versuche kämen außer den artspezifischen und strukturspezifischen[3]) Präcipitinreaktionen der Eiweißkörper auch andere Reaktionen, z. B. die Agglutinationsvorgänge, die Absättigung von Toxinen durch Antikörper, in Betracht.

Zum Schluß sei noch auf einen Punkt hingewiesen, der durch die frühere und die vorliegende Untersuchung eine neue Beurteilung erfährt. Es wurde festgestellt, daß Immunseren auf einfache anorganische Gruppen, z. B. den Arsinsäurerest, eingestellt sein können. Nach diesem Ergebnis wird eine prinzipielle Unterscheidung zwischen „Chemoceptoren" und andersartigen Receptoren im allgemeinen und insofern nur die eine Art bindender Gruppen in Immunkörpern vorkomme[4]), im Sinne von P. Ehrlich nicht mehr berechtigt, vielmehr anzunehmen sein, daß die immunchemischen und die chemotherapeutischen Effekte wenigstens in einem Teil der Fälle durch Affinitäten gleicher oder nahe verwandter Art verursacht werden. Dadurch besteht die Aussicht, mit Hilfe geeigneter Immunseren zur Erweiterung der Kenntnisse über die sogenannten Chemoceptoren beizutragen.

[1]) Diese Zeitschr. **58**, 362. 1913; vgl. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **20**, 211; **21**, 193; **26**, 122.

[2]) Journ. of Biolog. Chem. **33**, 7, S. 243, zit. nach Chem. Centralbl. 1919, I./II., S. 38.

[3]) Siehe die Arbeiten von Wells und Osborne über vegetabilische Proteine.

[4]) Vgl. Ehrlich, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **42**, H. 1; 1909. X. Tag. der Deutsch. dermatol. Ges. 1910, Nobelvortrag 1908 in Beitr. z. experim. Path. u. Chemother. Leipzig, Akad. Verlagsgesellsch., 1909, S. 190, 232, 245.

Digitized by Google

Eine Mikromethode zur Bestimmung der Kohlensäure des Blutes.

Von

A. Krogh und **G. Liljestrand.**

(Aus dem zoophysiologischen Laboratorium der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 26. Januar 1920.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Der Gehalt des Blutes an Kohlensäure während verschiedener Verhältnisse hat ja erhebliches physiologisches Interesse.

Ganz besonders ist dies der Fall geworden, seitdem Hasselbalch[1]) nachgewiesen hat, daß eine Bestimmung der Gesamtkohlensäure des Blutes bei bestimmter Spannung genügt, um die Wasserstoffzahl des Blutes, d. h. dessen aktuelle Reaktion, bei dieser Spannung zu berechnen. Bezeichnet man in gewöhnlicher Weise die Wasserstoffzahl mit p_H, gilt nämlich, wie Hasselbalch nachgewiesen hat auch für das Blut — wie für eine reine Bicarbonatlösung — die folgende Gleichung:

$$p_H = p_{K_1} + \log \frac{(\text{Bic.})}{(CO_2)},$$

wo p_{K_1} die ein für allemal bestimmte p_H bei äquivalenter Konzentration von Salz und Säure und (Bic.), bzw. (CO_2) die molaren Konzentrationen von Bicarbonat, bzw. freier (gelöster) CO_2 bedeuten. Von diesen Größen ist nur (Bic.) unbekannt. Sie kann aber durch Bestimmung der Gesamtkohlensäurekonzentration ermittelt werden, indem diese Größe, mit der Konzentration der freien CO_2 vermindert, die gesuchte Zahl ergibt. Die hierdurch eingeführte Methode zur Bestimmung der Wasserstoffzahl des Blutes gibt eine nicht unwesentlich größere Genauigkeit als die elektrometrische; außerdem gestaltet sich die Ausführung der Bestimmung einfacher nach der gasometrischen Methode.

In einer Arbeit von 1917 hat Parson[2]) einen Vergleich zwischen den elektrometrisch gemessenen Werten des p_H und den nach Hasselbalch berechneten mitgeteilt. Er findet einen vollständigen Parallelismus zwischen den beiden Reihen, jedoch beobachtet er auch — im Gegensatz zu Hassel-

[1]) Diese Zeitschr. **78**, 112. 1916.

[2]) Journ. of physiol. **51**, 440. 1917.

Digitized by Google

balch —, daß die berechneten p_H-Werte regelmäßig etwas niedriger als die elektrometrisch bestimmten liegen.

Hasselbalch braucht bei seinen Bestimmungen 5—10, bisweilen nur 3 ccm Blut; hebt aber hervor (a. a. O. S. 134), daß bei passender Wahl der Pumpe und des Luftanalysenapparats sogar kleinere Mengen ausreichen würden. Es liegt offen zutage, daß es von Bedeutung wäre, wenn die Methode in der Weise modifiziert werden könnte, daß sie auch bei noch kleineren Blutproben Verwendung finden kann. Um mehrere Kubikzentimeter Blut zu erhalten, braucht man im allgemeinen Venenpunktion auszuführen, was teils gewisse Unbehagen mit sich bringt, teils aber auch bei Serienuntersuchungen die Untersuchungen nicht unbedeutend erschwert. Die Möglichkeit, Serienbestimmungen auf dem fraglichen Gebiet auszuführen, ist zweifelsohne von Wert. Mit Rücksicht hierauf ist es wünschenswert, daß sich die Methode auch für so kleine Blutmengen anpassen läßt, wie man sie ohne Schwierigkeit aus einer Fingerbeere oder einem Ohrläppchen erhält.

Nach dem von Hasselbalch mitgeteilten Prinzip sind nun auch neulich von verschiedenen Seiten Bestimmungen des p_H an kleinen Blutmengen veröffentlicht worden. So haben Straub und Meier[1]) den CO_2-Gehalt in 0,1 ccm Blut mit dem Differentialblutgasapparat von Barcroft bestimmt. Betreffs der Genauigkeit wird angegeben, daß Barcroft eine Fehlerbreite von ± 3 Vol.-% erlaubt, d. h. eine Unsicherheit bei 50 Vol.-% bis zu 6%. Die Methodik von Straub und Meier ist in gewissen Hinsichten von Jarlöv[2]) näher kritisiert worden. Jarlöv und Sonne[3]), sowie Jarlöv haben entsprechende Bestimmungen an 0,5 bzw. 0,1—0,16 ccm Blut ausgeführt, wobei der Mikrorespirationsapparat von Krogh[4]) gebraucht wurde. Jarlöv gibt an, daß er in seinen Versuchen in Doppelbestimmungen ziemlich gute Übereinstimmung findet. (Abweichung 0 bis 6% des Wertes, jedoch nur selten mehr als 3%.) In drei Fällen wurden Kontrollversuche mit der Blutgaspumpe ausgeführt, indem teils etwa 12 ccm Blut mit der Pumpe analysiert wurden, teils in Parallelversuchen mit demselben Blut — bei annähernd derselben Spannung — die Mikromethode (0,15—0,16 ccm Blut) zur Anwendung kam. Mit der Mikromethode wurden immer Doppelbestimmungen ausgeführt, in zwei Versuchen sogar je zwei Paar Doppelbestimmungen, die dann zur selben Spannung als die mit der Pumpe untersuchten reduziert wurden. Die Abweichungen zwischen den Doppelbestimmungen waren in den verschiedenen Fällen 3,2, 1,6, 4,6, 3,2 und 3,6%, im Mittel also 3,3%, des Wertes. Die Mikromethode gab bzw. 2,2, 6,4 und 0,75% höhere Werte als die Pumpe. Da in diesen Fällen die verschiedenen Proben nicht aus identischer Blutportion kamen, ist es nicht ausgeschlossen, daß das unregelmäßige Verhältnis zwischen

[1]) Diese Zeitschr. **89**, 156. 1918.

[2]) Om syre-baseligevaegten i det menneskelige blod, saerlig ved sygdomme. Diss. Kopenhagen 1920.

[3]) Dtsch. Archiv f. klin. Med. **124**, 379. 1917—18.

[4]) Diese Zeitschr. **62**, 268; 1914 und **66**, 512; 1914.

Digitized by Google

Pumpe und Mikromethode zum Teil hieraus erklärt werden kann darüber läßt sich aber nichts mit Sicherheit sagen.

Im Jahre 1917 haben wir auch Versuche nach der von Barcroft und Haldane[1]) angegebenen Methode mit kleinen Blutquantitäten ausgeführt. Auch wir benutzten den von Krogh beschriebenen Mikrorespirometer mit den Modifikationen, die Andresen[2]) näher geschildert hat. Ein Kontrollbehälter und ein zur Aufnahme des Blutes bestimmter Behälter wirken auf einen empfindlichen Manometer. Am Pfropfen des letzterwähnten Behälters ist eine kleine Röhre gelassen. In dieser Röhre wurden zuerst 0,06 ccm einer 20 proz. Lösung von Weinsäure gegossen und ein kleiner Docht aus Filtrierpapier dort hineingebracht. In dem Behälter wurden nun 0,3 ccm Barcroftammoniak und 0,1 ccm des zu prüfenden Blutes sowie drei Glaskugeln gebracht. Nachdem das Gemisch durch Schütteln Lackfarbe erhalten hatte, wurden 0,045 ccm einer frisch zubereiteten gesättigten Lösung von Ferricyankalium zugefügt. Die beiden Behälter des Apparates wurden nun mit dem Manometer verbunden, in einem Wasserbade (von 17°) placiert und an einem Schaukelapparate während einiger Minuten lebhaft geschüttelt. Dann wurde das Manometer geschlossen und abgelesen. Darauf wurde wieder während 2 Minuten geschüttelt, bis eine neue Ablesung am Manometer ergab, daß der Wert konstant war. Jetzt wurde die Weinsäure aus der kleinen Röhre in die übrige Flüssigkeit gegossen, und es wurde während 6—7 Minuten kräftig geschüttelt. Nach Ablesung des Manometers wurde nochmals geschüttelt zur Kontrolle, daß die CO_2 gänzlich ausgetrieben war. Die Berechnung der ausgetriebenen Kohlensäuremenge geschieht nach der von Krogh angegebenen Formel, die übrigens mit der von A. V. Hill[3]) neulich aufgestellten Formel identisch ist. In gewöhnlicher Weise wird für die in den Reagenzlösungen und in der Luft des Behälters vom Anfang an vorhandene Kohlensäure korrigiert, indem ein Blindversuch mit ausgekochtem Wasser statt Blut ausgeführt wird.

Es zeigte sich bald, daß die Methode in dieser Form nicht genügend konstante Werte gab. Eine wesentliche Fehlerquelle war offenbar der CO_2-Gehalt der Luft des Behälters. Barcroft und Haldane raten dazu, die CO_2-Bestimmung immer in einem gut ventilierten Zimmer auszuführen, damit nicht der abnorm hohe CO_2-Gehalt in dem Behälter am Anfang des Versuchs zu Fehlern Anlaß gibt. Indessen dürfte dies bei den kleinen hier in Frage kommenden absoluten Werten nicht befriedigend sein. Auch wenn der Behälter, der in diesen Fällen beinahe 10 ccm Inhalt hatte, reine atmosphärische Luft enthielt, kommen darauf etwa 3 cmm CO_2, was hier sicher eine große Rolle spielen kann, wenn diese Menge von der ammoniakalischen Flüssigkeit aufgenommen wird. Da nun auch die Luft im Behälter durch Strömungen mit Zimmerluft verunreinigt werden kann, ist es höchst wahrscheinlich, daß die Menge CO_2, die aufgenommen wird,

[1]) Journ. of physiol. **38**, 232. 1902.
[2]) Diese Zeitschr. **74**, 357. 1916.
[3]) Journ. of physiol. **50**, VII. 1915—16.

Digitized by Google

leicht viel höher und schwankend wird. Wir ließen deshalb einen CO_2-freien Luftstrom durch Behälter und Manometer während der Einfüllung der verschiedenen Flüssigkeiten und bis zur Verbindung des Behälters mit dem Manometer streichen. Die Ergebnisse wurden jetzt etwas besser, allerdings zeigten Doppelbestimmungen in der Regel eine Abweichung von 5—10% voneinander. Außerdem war das Ausgießen der Weinsäure aus der Röhre nicht selten mit Schwierigkeiten verbunden und gelang bisweilen erst nach heftigem Schütteln. Diese Unannehmlichkeiten waren auch nicht durch Paraffinieren der Röhre gänzlich zu entgehen. Die wenig befriedigende Genauigkeit der CO_2-Bestimmung hat wahrscheinlich z. T. seine Ursache darin, daß sie auch von der Vollständigkeit der vorhergehenden O_2-Austreibung abhängt. (Auch bei dem ursprünglichen Verfahren von Barcroft und Haldane wird die CO_2-Bestimmung weit weniger zuverlässig als die O_2-Bestimmung.) Möglicherweise kommt noch hinzu, daß der CO_2-freie Luftstrom, auch wenn er kräftig ist und der Behälter an seiner Mündung mit einem Kragen von Kautschuk versehen wird, nicht genügend effektiv wird.

Es schien uns deshalb wünschenswert, eine Methode zur CO_2-Bestimmung ausarbeiten zu können, wo einerseits der O_2-Gehalt des Blutes nicht zuerst ausgetrieben werden mußte, andererseits das Hinausgießen einer Flüssigkeit aus der kleinen angeblasenen Röhre während der Bestimmung entgangen werden konnte. Wenn aber Weinsäure in der früher gebrauchten Konzentration direkt zum Blute gesetzt wird, geht nicht nur die Kohlensäure, sondern auch, wenigstens zu einem Teil, der Sauerstoff fort, was sich aus der bald eintretenden Braunfärbung des Blutes ergibt. Wir prüften dann einige verschiedene Säurelösungen in ihrer Wirkung auf das Blut. Am besten fielen die Versuche mit 4 proz. Borsäurelösung aus. Das mit O_2 gesättigte Blut behielt nach Zusatz des gleichen Volumens 4 proz. Borsäurelösung seine Farbe unverändert; es galt also zu bestimmen, inwieweit CO_2 gut ausgetrieben wurde. Damit die früher erwähnten Unannehmlichkeiten beim Ausgießen der Flüssigkeit entgangen werden sollten, verfuhren wir so, daß das Blut unter einer Schicht von 4 proz. Borsäurelösung gegossen wurde. (Es kam hierbei der unten näher zu beschreibende Behälter zur Anwendung.) Die Behälter, sowie das Blut und die Borsäurelösung waren im voraus in dem Wasserbade placiert. Unmittelbar nach der Einführung des Blutes wurde der Propfen des Behälters festgesetzt, die Behälter unter der Wasseroberfläche gebracht und das Manometer geschlossen. Jetzt begann das Manometer sogleich zu steigen, offenbar weil die CO_2 in der Grenzschicht von der Borsäure-

Digitized by Google

lösung ausgetrieben wurde und durch die Säureschicht diffundierte. Hierdurch entsteht eine Fehlerquelle, indem nicht zu vernachlässigende CO_2-Mengen hindurchgehen können, ehe der Temperaturausgleich eingetreten ist, und also der Ausgangspunkt bei der Bestimmung nicht scharf wird. Es wurde deshalb eine schützende Schicht von 15 proz. Glycerinlösung (spez. Gew. 1,036 bei 15°) am Boden des Behälters hineingebracht, nachdem die Borsäurelösung (spez. Gew. 1,015) eingeführt worden war. Dann wurde zuletzt das Blut (spez. Gew. 1,055) unter den beiden übrigen Flüssigkeiten geschichtet, der Propfen befestigt, die Behälter unter die Wasseroberfläche versenkt und einer Minute nachher (damit der Temperaturausgleich im wesentlichen vollständig sein soll) das Manometer verschlossen. Jetzt zeigt sich während der ersten Minute eine unbedeutende Verschiebung des Manometers, der von ganz derselben Größe wie in Kontrollversuchen ohne Blut war und offenbar von dem letzten Teil des Temperaturausgleichs verursacht wurde. Erst nach einigen Minuten diffundierte CO_2 durch die oberen Flüssigkeiten. Es wurde deshalb hier wie im folgenden der Stand des Manometers genau drei Minuten nach dem Verschluß desselben als Ausgangspunkt benutzt. Der Blindwert der gebrauchten Lösungen wurde in genau derselben Weise (d. h. mit demselben Ausgangspunkt, Zeit des Schüttelns usw.) bestimmt. In der geschilderten Form gab die Methode viel bessere Übereinstimmung zwischen Doppelanalysen als vorher: im allgemeinen betrug der Unterschied nur 1—2% des Ergebnisses. Zwei Versuche, wo Blutproben teils in gewöhnlicher Weise, mit Hilfe der Blutgaspumpe, teils nach der eben geschilderten Methode auf ihr CO_2-Gehalt untersucht wurden, zeigten, daß die letztere nur 82—83% der Gesamtkohlensäure gab.

Um eine effektivere Austreibung des CO_2 zu erhalten, wurde dann mit verschiedenen Säuregemischen probiert. Es galt einerseits, einen genügenden Aciditätsgrad des Gemisches zu haben, damit die möglichst vollständige Entfernung der CO_2 stattfinden sollte, andererseits aber, daß das Oxyhämoglobin nichts von seinem O_2-Gehalt abgeben sollte.

In Übereinstimmung mit dem oben Angeführten war auch hier eine Flüssigkeitsschicht zwischen der Blutprobe und dem Säuregemisch wünschenswert. Um aber die Effektivität dieser Lösung zu vergrößern, haben wir die 15 proz. Glycerinlösung

Digitized by Google

mit einem schwachen, als Puffer wirksamen Phosphatgemisch nach Sörensen[1]) versetzt.

Bei den jetzt folgenden Versuchen wurde nach und nach mit Säuregemischen von verschiedener, aber bekannter Wasserstoffionenkonzentration geprüft. Zu diesem Zweck haben wir Lösungen, die nach den Vorschriften von Sörensen dargestellt wurden, gebraucht. Es wurde teils die von ihm angegebene Citratlösung (im folgenden „Citrat" genannt), teils Gemische von dieser mit nach seinen Vorschriften bereiteten 0,1 n-NaOH-, bzw. 0,1 n HCl-Lösungen (im folgenden bzw. NaOH und HCl genannt) gebraucht.

In einigen Probiergläschen wurden zuerst Mischungen von 1 ccm mit O_2 gesättigtes Blut und 3 ccm der erwähnten Pufferlösung gebracht und zu diesen je 3 ccm von Citrat ($p_H = 4{,}96$), von 7 Tl. Citrat und 3 Tl. NaOH ($p_H = 5{,}568$) und von 6 Tl. Citrat und 4 Tl. HCl ($p_H = 4{,}17$) gesetzt. In den beiden ersten war die Farbe nach 6 Stunden unverändert, in der letzten konnte nach etwa 1 Stunde eine schwache Farbenänderung gesehen werden, die nach 5 Stunden sehr ausgeprägt war (Methämoglobinbildung). Dann wurde in Parallelversuchen bestimmt, wie sich die Werte zueinander verhielten, die bei der Verwendung von je 0,3 ccm der folgenden Säuregemische erhalten wurden (dazu immer 0,1 ccm Blut, mit O_2 gesättigt, und 0,3 ccm der Pufferlösung): Citrat, 9 Citrat + 1 HCl, 8 Citrat + 2 HCl, 7 Citrat + 3 HCl, 6 Citrat + 4 HCl, 5 Citrat + 5 HCl. Die folgende Tabelle gibt die betreffenden Werte wieder, wobei der mit Citrat gewonnene Wert gleich 100 gesetzt wird.

Tabelle I.

Relative Abgabe von Blutgasen bei verschiedenen Säuregemischen.

Säuregemisch	p_H des Säuregemischs	Relative Abgabe von Gas
7 Citrat + 3 NaOH	5,57	92
9 „ + 1 „	5,08	98
Citrat	4,96	100
8 Citrat + 2 HCl	4,66	103
7 „ + 3 „	4,43	104
6 „ + 4 „	4,17	103
5 „ + 5 „	3,66	103
4 „ + 6 „	2,93	104

[1]) Diese Zeitschr. 21, 131; 1909 und 22, 352; 1909.

Digitized by Google

In keinem dieser Versuche war irgendeine Farbenveränderung des Gemisches zu sehen. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, bekamen wir von einem p_H von 4,66 bis 2,93 konstante Werte. Im folgenden haben wir die zweitstärkste unter diesen Säuregemischen, d. h. 5 Citrat + 5 HCl, gebraucht.

Da die Methode — mit diesem Säuregemisch — bei der unten anzuführenden Prüfung unserer Ansicht nach genügende Zuverlässigkeit gegeben hat, sind wir bei ihr geblieben und möchten sie nun näher beschreiben.

Während das Blut in später zu beschreibender Weise unter dem gewünschten CO_2- und genügenden O_2-Druck gesättigt wird, werden die Analysenapparate — im allgemeinen empfiehlt es sich, Doppelbestimmungen auszuführen — fertiggestellt.

Die erforderlichen Lösungen sind:

1. Das Säuregemisch, bestehend aus gleichen Volumina der 0,1 n-HCl und Citrat nach Sörensen. (0,525 g krystallisierte Citronensäure werden in 5 ccm n-NaOH gelöst und dann mit destilliertem Wasser zu 25 ccm verdünnt, wonach 25 ccm der 0,1 n-Salzsäure zugesetzt werden.)

2. Die Pufferlösung, die auf 85 Teile Wasser 15 Gewichtsteile reinstes Glycerin, 0,097 g sekundäres und 0,016 g primäres Phosphat nach Sörensen enthält.

Das zu den Lösungen gebrauchte Wasser muß CO_2-frei sein und wird zweckmäßig durch Redestillation unter Barytzusatz gewöhnlichen destillierten Wassers gewonnen. Nachdem die Lösungen fertiggestellt sind, werden sie in dem bei den Analysen für die Mikrorespirationsapparate gebrauchten Wasserbade placiert. Wenn sie die Temperatur des Bades angenommen haben, werden sie mit CO_2-freier Luft bei dieser Temperatur gesättigt. Die Lösungen werden auch später in dem Wasserbade und gegen die CO_2 der Atmosphäre geschützt aufbewahrt. Der „Blindwert" beträgt bei den neubereiteten Lösungen gewöhnlich etwa 1 cmm. Während der ersten Tage hält sich dieser Wert ziemlich unverändert, dann steigt er gewöhnlich mehr oder weniger, wobei auch eine Trübung auftreten kann. (Später ist deutliche Schimmelbildung die Regel.) Zusatz von Thymol macht die Lösungen etwas haltbarer, jedoch muß man sich durch Blindversuche vergewissern, daß sie brauchbar sind.

Digitized by Google

In den Kontrollbehälter des Apparates, dessen Form ja ziemlich gleichgültig ist, werden 0,6 ccm Wasser ein für allemal gebracht. Der zur Aufnahme des Blutes abgesehene Behälter hat zweckmäßig das Aussehen der Abb. 1 und ein Volumen von etwa 5 ccm. Er kann leicht aus einer gewöhnlichen U-Röhre geblasen werden. Durch Holzstücken und einem Kautschukband wird er am Mikrorespirationsapparat gut fixiert und so placiert, daß das Wasser des Bades nur einige Millimeter vom freien Rande steht. Im Behälter, der wie auch der Kontrollbehälter genügend lange im Wasserbade gehalten wird, damit er die Temperatur nimmt, werden 3 Glaskugeln gebracht und dann mit graduierten Pipetten am Boden des Gefäßes zuerst 0,3 ccm des Säuregemisches und dann darunter 0,3 ccm der Pufferlösung geführt. Endlich werden 0,1 ccm des Blutes — oder, wenn es erwünscht erscheint, sogar eine kleinere Menge — unter der Pufferlösung am Boden geschichtet. Schnell wird jetzt der gut geschmierte Pfropfen am Behälter gebracht, die Behälter gänzlich unter Wasser geführt und nach einer Minute das Manometer verschlossen. Während der ganzen Bestimmung wird Luft durch das Wasserbad geleitet. In den nächsten 4 Minuten — die letzte als Kontrolle — werden jede Minute regelmäßige Ablesungen am Manometer ausgeführt. Dann wird während 8 Minuten lebhaft geschüttelt (vgl. die von Andresen[1]) beschriebene Anordnung) und abgelesen. Schließlich wird zur Kontrolle noch ein- bis zweimal während einiger Minuten geschüttelt und abgelesen.

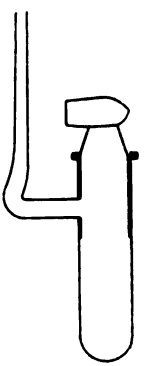


Abb. 1. Behälter für die Aufnahme des Blutes.

Von der erhaltenen manometrischen Differenz wird der Blindwert der Lösungen subtrahiert. Jedes Millimeter Manometerdifferenz entspricht für den betreffenden Apparat einen bestimmten Wert, der ein für allemal festgestellt wird (vgl. Krogh). Zu bemerken ist, daß eine Korrektion wegen der CO_2-Menge, die in der Flüssigkeit gelöst bleibt, nötig ist. Wir nehmen (vgl. Barcroft und Haldane) bei 17° einen Absorptionskoeffizienten der Flüssigkeitsmischung von 0,85 an. (Auch ein nicht unwesentlicher Fehler dieser Zahl ist, wie die Rechnung ergibt, von sehr geringem Einfluß.) Am einfachsten geschieht die Korrektion dadurch, daß

[1]) Diese Zeitschr. **99**, 5. 1919.

Digitized by Google

bei der Berechnung des gegen 1 mm Manometerdifferenz sprechenden Wertes das Volumen der Flüssigkeit nur mit 0,15 seines tatsächlichen Wertes in der Rechnung tritt. — Wie aus der später angeführten Prüfung hervorgeht, gibt die Methode 93% des Wertes der Blutgaspumpe. Der erhaltene Wert ist deshalb mit dem Faktor 1,075 zu multiplizieren.

Wir führen unten eine Doppelbestimmung mit unserer Methode als Beispiel an.

	Apparat A.			Apparat B.		
Zeit	Manometerablesungen (mm)			Manometerablesungen (mm)		
	links	rechts	Bemerkungen	links	rechts	Bemerkungen
$8^h27'$			Manometer geschl.			Manometer geschl.
$8^h28'$	108,3	97 6		101,0	85,0	
$8^h29'$	109,3	97,0		101,4	84,7	
$8^h30'$	**109,6**	**96,7**		**101,6**	**84,4**	
$8^h31'$	109,9	96,4		101,7	84,3	
$8^h32'$	110,0	96,2		101,8	84,2	
			wird geschüttelt			wird geschüttelt
$8^h40'$	169,7	38,2		159,0	**26,2**	
$8^h41'$			" "			" "
$8^h46'$	170,0	37,8		160,6	25,8	
$8^h48'$			" "			" "
$8^h55'$	**170,1**	**37,7**		**160,6**	**25,8**	
Differenz:						
	60,5 + 59,0 = 119,5			59,0 + 58,6 = 117,6		
Blindwert:		−2,0			−2,0	
		117,5			115,6	

1 mm Manometerdifferenz entspricht für den Apparat A 0,453 cmm und für den Apparat B 0,459 cmm. Die gefundenen Werte sind also bzw. 53,2 und 53,1%, woraus nach Multiplikation mit dem Faktor 1,075 die tatsächlichen Werte, 57,2 und 57,1 Vol.-% erhalten werden.

Zur Kontrolle der Methode wurden Parallelbestimmungen mit ihr und der Blutgaspumpe ausgeführt. Es wurden in einer ersten Versuchsreihe (1917) 5 Proben von je 15 ccm frischem defibriniertem Ochsenblut in einem Saturator nach Barcroft[1]), bei einem CO_2-Druck von etwa 35 mm (der Druck wurde in diesen Versuchen nicht exakt gemessen) bei 18° gesättigt. Die eine Probe war im übrigen nicht vorbehandelt, zwei von ihnen waren mit

[1]) The respiratory function of the blood, Cambridge 1914, S. 304.

Digitized by Google

0,007 bzw. 0,015 g Natriumbicarbonat, die zwei letzten mit 0,375 bzw. 0,565 ccm Milchsäure versetzt. Nach eingetretener Sättigung der Proben wurden 5 ccm in der Pumpe in gewöhnlicher Weise analysiert. Gleichzeitig wurden je zwei Proben von 0,1 ccm nach unserer Methode analysiert. In einer späteren Versuchsreihe (1919) wurden teils Versuche mit Ochsenblut bei 16°—18° und variierendem CO_2-Drucke, teils mit frischem Menschenblut, sowohl bei 16°—18°, wie bei 37°—38° und bei mittlerem CO_2-Drucke, ausgeführt. Hierbei kam in einigen Fällen nur eine Mikroanalyse. In der Tabelle II werden sämtliche Kontrollversuche mitgeteilt. In besonderen Reihen werden die Abweichungen der Doppelanalysen nach der Mikromethode, das Verhältnis der Mikroanalyse zur Pumpe, sowie die nach Hasselbalch berechneten p_H-Werte angeführt. Betreffs der letzterwähnten wird bei den Versuchen von 1917 mit der approximativen CO_2-Spannung von 35 mm gerechnet. In den übrigen Fällen ist die Spannung (mit Ausnahme des ersten Versuchs vom 18. XI.) bestimmt worden.

Betreffs des Versuchs mit dem niedrigen CO_2-Drucke vom 17. I. ist der erhaltene CO_2-Gehalt so hoch, daß der Verdacht nicht unberechtigt erscheint, daß hier kein vollständiger Ausgleich

Tabelle II.

Kontrollversuche. CO_2 in Vol.-%.

Zeit	Bestimmungen mit der Mikromethode A	Bestimmungen mit der Mikromethode B	Abweichungen in Vol.-%	Mittel beobachtet	Mittel korrigiert	Bestimmung mit der Pumpe	Verhältnis der Mikromethode zur Pumpe	CO_2-Spannung mm	Temperatur	p_H ber. n. d. Korr.Mittel d.Mikrometh de	p_H ber. n. der Pumpe	Bemerkungen
1917												
22. II.	30,6	31,8	1,2	31,2	33,6	33,2	0,940	ca. 35	18°	7,08	7,07	Ochsenblut, 0,565 ccm Milchs. auf 15 ccm Blut.
22. II.	41,0	40,7	0,3	40,9	44,0	43,6	0,938	ca. 35	18°	7,19	7,18	Ochsenblut, 0,375 ccm Milchs. auf 15 ccm Blut.
22. II.	57,8	58,6	0,8	58,2	62,6	62,4	0,933	ca. 35	18°	7,34	7,33	Ochsenblut.
22. II.	73,0	71,5	1,5	72,3	77,7	79,0	0,915	ca. 35	18°	7,42	7,43	Ochsenblut, 0,007 g Bicarb. auf 15 ccm Blut.
22. II.	75,7	77,6	1,9	76,6	82,4	82,2	0,982	ca. 35	18°	7,44	7,44	Ochsenblut, 0,015 g Bicarb. auf 15 ccm Blut.
1919												
17. XI.	19,7	20,2	0,5	19,95	21,5	21,5	0,928	2,1	16—18°	7,17	7,17	Ochsenblut.
17. XI.	62,3	61,7	0,6	62,0	66,7	67,1	0,924	56,0	16—18°	7,14	7,14	Ochsenblut.
17. XI.	56,9	56,4	0,5	56,7	61,0	63,4	0,894	45,4	16—18°	7,19	7,21	Ochsenblut.
18. XI.	—	43,6	—	—	46,8	46,0	0,948	—	16—18°	—	—	Menschenblut (G. L.).
18. XI.	—	60,2	—	—	64,7	64,5	0,968	32,2	16—18°	7,38	7,38	Menschenblut (G. L.).
20. XI.	—	39,2	—	—	42,2	42,2	0,929	40,4	37,5°	7,24	7,24	Menschenblut (J. L.).
20. XI.	44,1	45,0	0,9	44,6	47,9	47,7	0,935	42,0	37,5°	7,28	7,28	Menschenblut (G. L.).

Digitized by Google

stattgefunden hat. Für den Zweck des Versuchs ist dies ja aber gleichgültig. Die Dispersion der Mikrobestimmungen (= mittlere Abweichung einer Einzelbestimmung) ist $\pm 0{,}8$ Vol.-% CO_2. Der mittlere Fehler der Doppelbestimmungen ist $\pm 0{,}6$ Vol.-% CO_2. Die Versuche umfassen einen mit Rücksicht auf die Schwankungen des CO_2-Gehaltes großen Bereich. Die Mittel der Mikromethode weisen einen Unterschied gegenüber den mit der Pumpe gefundenen Mittel auf, der innerhalb der untersuchten Grenzen konstant ist. Im Mittel gibt unsere Methode $0{,}93 \pm 0{,}004$ des Wertes der Pumpe (mit einer mittleren Abweichung der einzelnen Beobachtung von $\pm 0{,}013$). Die mit der Mikromethode gefundenen Werte sind also mit dem Faktor 1,075 zu multiplizieren.

Bei der Ausführung der CO_2-Bestimmung muß ja das Blut mit CO_2 bei gemessener Spannung gesättigt sein. Nach der Beschreibung der CO_2-Bestimmungsmethode wenden wir deshalb die Aufmerksamkeit auf die Frage der Sättigung. Will man die Vorteile einer Mikromethode brauchen, ist es offenbar notwendig, einen Saturator zu brauchen, der für ganz kleine Blutmengen abgesehen ist. Ein solcher Saturator ist von Kato[1]) beschrieben worden. Wir haben einen ähnlichen, jedoch etwas größeren Apparat geprüft, fanden ihn aber nicht befriedigend und haben deshalb folgendes Verfahren benutzt.

Die Sättigung des Blutes geschieht zweckmäßig entweder bei Körpertemperatur oder bei Zimmertemperatur (18°). In einer Pipette von 100 ccm wird im voraus die zur Sättigung gewünschte Gasmischung bereitet. Da es bei der folgenden CO_2-Bestimmung des Blutes notwendig ist, daß das Hämoglobin vollkommen mit O_2 gesättigt ist — sonst wird nämlich O_2 während des lebhaften Schüttelns aufgenommen und somit ein zu niedriger Wert für die CO_2 erhalten —, muß man, falls die Sättigung bei 37° stattfindet, darauf achten, daß der O_2-Gehalt der Gasmischung ziemlich hoch ist. Man macht deshalb eine Mischung, die etwa 70—90% O_2 hält neben dem gewünschten CO_2-Gehalt. Wird die Sättigung bei 18° ausgeführt, ist es hinreichend, die Gasmischung aus atmosphärischer Luft und CO_2 zu bereiten. Von der gut gemischten und auf CO_2 analysierten Gasmischung geht eine feine Leitung zum Saturator. Zuerst kommt jedoch ein kleines Hg-Manometer, das in einer T-Röhre eingepaßt wird, dann eine,

[1]) Journ. of physiol. **50**, 37. 1915.

Digitized by Google

in dem für den Saturator abgesehenen Wasserbad placierte Röhre mit Wasser, wo die hindurchgehende Luft mit Wasser gesättigt wird. Das Blut, das leicht in genügender Menge aus einem Ohr oder einer Fingerbeere gewonnen wird, wird in einem Zwergreagenzgläschen, dessen Wände mit fein gepulvertem Kaliumoxalat bestreut sind, aufgefangen und geschüttelt. (In einigen Fällen, da eine größere Blutmenge gewünscht war, wurde Venenpunktion ausgeführt und das Blut entweder mit Oxalat — $1^0/_{00}$ — versetzt oder defibriniert.) Danach wurden 0,25—0,30 ccm, die für zwei Analysen ausreichend sind, in den Saturator gebracht. Dieser hat die in Abb. 2a angegebene Form und wird leicht aus einer gewöhnlichen 10 ccm Pipette geblasen. Er besteht aus einer zylindrischen Röhre, die in beiden Enden allmählich schmäler wird und dann kurze schmale Röhrenansätze hat, von denen der eine, längere, geschlossen ist. Nach der Einführung des Blutes wird die Öffnung mit einem Finger verschlossen, und durch Schütteln werden die Wände des Saturators vollständig mit Blut gefeuchtet. Nach Abtrocknen der Öffnung wird ein dicht schliessender, kurzer Schlauch darüber gestülpt und nun eine capillare Röhre durch den Schlauch geführt. Der Schlauch ist so gewählt, daß er mäßig dicht an der Capillare liegt, so daß der Saturator um derselben gedreht werden kann. Die Capillare wird nun mit der Leitung von der Gasmischung verbunden, durch vorsichtige Regulierung mit Klemmhähnen wird Luft von dieser durch den Saturator getrieben, er wird mit der Hand gedreht, und die Capillare wird weit in der kleinen geschlossenen Röhre geschoben. Jetzt wird der Saturator in dem Wasserbad geführt und mit Hilfe des in der Abb. 2b abgebildeten Apparates auf einer Achse festgemacht. Diese Achse verläuft in horizontaler Richtung durch einen in der Wand des Wasserbades sitzenden Pfropfen und wird von einem außerhalb des Bades stehenden Motor getrieben. Jetzt wird der Motor unmittelbar in Gang gesetzt. Am besten wird noch die Capillarröhre oder der Luftzuleitungsschlauch im

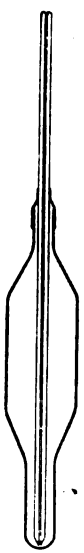


Abb. 2a. Saturator.

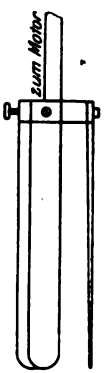


Abb. 2b. Anordnung zur Befestigung des Saturators.

Digitized by Google

Wasserbade fixiert. Der Saturator wird langsam (etwa 4—5 mal pro Minute) um die Capillare gedreht, und die ganze Zeit wird der Überdruck so reguliert, daß kleine Gasblasen zwischen dem Schlauch des Saturators und der Capillare entweichen. Es ist notwendig, nicht mehr als der erwähnten Blutmenge zu nehmen. Bei größerer Menge tritt nämlich Schaumbildung ein, und Blut (nicht nur der Überschuß) tritt in das Wasserbad hinaus. Während der Sättigung, die in 15 Min. beendigt ist, wird das Hg-Manometer ab und zu abgelesen. Es wird möglichst konstant gehalten. Die Gasmischung (100 ccm) genügt wenigstens zu zwei Bestimmungen. Nach beendigter Sättigung wird der Saturator vorsichtig losgenommen, der offene Teil wird über die Wasseroberfläche gehalten und abgetrocknet, die Capillare wird ausgezogen — erst jetzt wird der Gasstrom abgestellt — und die Öffnung geschlossen. Der Saturator wird senkrecht im Wasserbade gehalten, wobei das Blut sich in dem schmalen unteren Teil ansammelt, von dort wird es jetzt mit einer Pipette aufgesogen; die Pipette ist in einer langen capillaren Spitze ausgezogen, die durch den Schlauch geführt wird. Oberhalb der Capillare ist sie mit drei Marken versehen, die in Abständen entsprechend 0,1 ccm stehen. Wir haben es praktisch gefunden, die Pipette mit einem Präzisionsregulator nach Weichardt[1]) zu versehen. Das aufgesogene Blut wird sofort in den bereitstehenden, mit den übrigen Lösungen schon versehenen Behälter der Analysenapparate entleert.

Bei der Berechnung des CO_2-Druckes muß offenbar der Barometerdruck mit dem am Manometer abgelesenen Wert vermehrt werden und die Tension des Wasserdampfes wie gewöhnlich abgezogen werden.

Die Tatsache, daß bei der Sättigung bei 37° eine sehr O_2-reiche Gasmischung gebraucht wird, bewirkt offenbar, daß eine relativ große O_2-Menge physikalisch gelöst wird, die dann im Analysenapparat zum Teil frei wird. Daß hierbei keine in Betracht kommende Fehlerquelle entsteht, zeigt die folgende Berechnung. Mit Benutzung der von Bohr[2]) angegebenen Zahlen für die Absorptionskoeffizienten des Blutes findet man die Mengen O_2 und N_2 in Vol.-%, die bei 37° bzw. 17° gelöst werden:

[1]) Abderhaldens Handbuch der biochem. Arbeitsmeth. 1, 24. 1910.
[2]) Nagels Handbuch d. Physiol. 1, 63. 1912.

Digitized by Google

bei 37° (80% O_2 und 15% N_2) : $2{,}2 \cdot 0{,}80 + 1{,}1 \cdot 0{,}15 = 1{,}9$,
bei 17° (21% O_2 und 79% N_2) : $2{,}9 \cdot 0{,}21 + 1{,}5 \cdot 0{,}79 = 1{,}9$.

Mit der jetzt geschilderten Methode haben wir eine Anzahl Versuche an menschlichen Blute bei Ruhe ausgeführt, sämtliche mit einer einzigen Ausnahme bei 37° gesättigt. Die Bestimmungen werden in der Tabelle III mitgeteilt.

Tabelle III.

Bestimmungen an Menschenblut. CO_2 in Vol.-%.

Versuchstag	CO_2-Spannung mm Hg	Vol.-% CO_2 korr. Bestimm. A	B	Abweichung in %	Bemerkungen
18. XI.	32,1	39,6	—	—	Defibrin. Blut von G. L., 3 Stunden n. d. Entnahme.
18. XI.	32,0	39,8	39,4	0,4	„ „ „ G. L., 4 „ „ „ „
18. XI.	32,4	39,2	38,1	1,1	Oxalatblut v. G. L., 5 „ „ „ „
19. XI.	37,9	44,0	44,5	0,5	Defibrin. Blut „ G. L., 20 „ „ „ „
19. XI.	68,5	59,0	—	—	„ „ „ G. L., 28 „ „ „ „
19. XI.	69,0	61,0	—	—	„ „ „ G. L., 30 „ „ „ „
21. XI.	40,4	41,9	42,5	0,6	Oxalatblut „ G. L., unmittelbar „ „ „
21. XI.	28,6	35,6	36,1	0,5	„ „ G. L., 1,5 Stunden „ „ „
24. XI.	42,0	47,4	48,4	1,0	„ „ G. L., unmittelbar „ „ „ Mit d. Pumpe: 47,7 (Tab. II).
25. XI.	57,3	54,0	54,0	0,0	„ „ G. L., 1 Stunde n. d. Entnahme
1. XII.	73,4	57,2	57,1	0,1	„ „ G. L., unmittelbar „ „ „
1. XII.	17,4	—	33,2	—	„ „ G. L., „ „ „ „
6. XII.	44,0	69,0	68,6	0,4	„ „ G. L., „ „ „ „ Sättigung bei 18°.
20. XI.	40,4	—	42,2	—	„ „ J. L., unmittelbar n. d. Entnahme. Im Saturator 45 Min. Mit der Pumpe 42,2 (Tab. II).
5. XII.	41,7	44,4	44,9	0,5	„ „ J. L., unmittelbar n. d. Entnahme.
21. XI.	19,0	32,8	—	—	„ „ A. K., „ „ „ „
27. XI.	34,4	45,9	44,7	1,2	„ „ A. K., „ „ „ „
29. XI.	48,2	48,9	49,2	0,3	„ „ A. K., „ „ „ „
1. XII.	75,1	53,7	53,9	0,2	„ „ A. K., „ „ „ „
28. XI.	36,8	45,4	47,5	2,1	„ „ K. L. A., „ „ „ „
6. XII.	41,9	45,8	46,2	0,4	„ „ E. H., 4 Stunden „ „ „

In der Tabelle wird angegeben, wie spät nach der Probeentnahme das Blut in den Saturator gebracht wurde. Vor diesem Zeitpunkt wurde es auf Eis aufbewahrt. In einem Versuch der Tabelle geschah die Sättigung bei 18°, in allen übrigen bei 37°—37,5°. Im Saturator blieb das Blut 15—20 Min. mit Ausnahme eines Versuchs (20. XI.) bei J. L., wo es 45 Min. im Saturator blieb.

Die Dispersion der Bestimmungen in dieser Reihe beträgt nach den Abweichungen der Doppelbestimmungen $\pm$ 0,6 Vol.-% und der mittlere Fehler der Doppelbestimmungen somit $\pm$ 0,4

Digitized by Google

Vol.-%. Das aber unter Umständen noch bessere Übereinstimmung erhalten wird, zeigt die folgende Reihe von fünf Bestimmungen an derselben Probe (Spannung nicht gemessen): 57,5, 58,4, 58,1, 58,8,58,6%. Das Mittel ist 58,3 $\pm$ 0,23, und die mittlere Abweichung der einzelnen Bestimmung beträgt 0,45 Vol.-%.

Die größte Zahl der Versuche wurde an G. L. ausgeführt; sie werden in der Abb. 3 graphisch wiedergegeben. Es findet sich kein sicherer Unterschied zwischen ganz frischem Blut und Blut, das mehrere Stunden, sogar 30 Stunden auf Eis aufbewahrt wurde. Daß dagegen die Zeit im Saturator von erheblicher Bedeutung ist, haben Christiansen, Douglas und Haldane[1]) nachgewiesen. Deutlich geht dies auch hervor bei J. L., wo der Wert 42,1 Vol.-% bei 40,4 mm Spannung erhalten wurde (Kontrolle mit der Pumpe!), wenn die Zeit im Saturator 45 Min. betrug, während aus den Bestimmungen von 5. XII. durch Reduktion zu 40,4, 44,3 Vol.-% gefunden wird, d. h. ein um 2,2 Vol.-% höheren Wert. (Christiansen, Douglas und Haldane erhielten eine ganz ähnliche Erniedrigung um 2,6 Vol.-%, wenn die Zeit im Saturator von 19 auf 54 Min. verlängert wurde.)

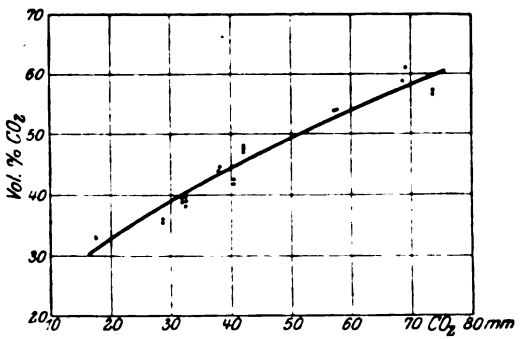


Abb. 8. CO_2-Gehalt des Blutes in Vol.-% bei G. L. bei verschiedenen CO_2-Spannungen.

Bei drei von den fünf Versuchspersonen, G. L., J. L. und E. H., liegen die Werte nicht unbedeutend niedriger als sie im allgemeinen früher angegeben werden. In Übereinstimmung damit wird der reduzierte p_H für sie bzw. 7,275, 7,27 und 7,28, für A. K. 7,295 und für K. L. A. 7,30, während Jarlöv als die äußersten Grenzen 7,28 bzw. 7,34 findet. Zu bemerken ist aber, daß G. L. und J. L. (wahrscheinlich auch nach Bestimmungen im Sommer 1919, E. H.) einen ziemlich niedrigen alveolären CO_2-Druck zeigten. Im Mittel wurde nämlich bzw. 35,7 und 34,9 mm gefunden. Es muß nun aber als nicht unwahrscheinlich betrachtet werden, daß eben in solchen Fällen die reduzierte p_H-Zahl niedrig

[1]) Journ. of physiol. 48, 244. 1914.

Digitized by Google

ausfallen soll. (Obgleich Christiansen, Douglas und Haldane in ihren Versuchen keine solche Abhängigkeit fanden). Die regulierte p_H-Zahl wurde somit sowohl für G. L. als für J. L. 7,30.

In vielen Fällen dürfte es am einfachsten sein — vor allem, wenn nur Änderungen des p_H während des Versuchs von Interesse sind —, die Sättigung des Blutes bei Zimmertemperatur auszuführen. Man gewinnt dabei noch einen Vorteil, indem das Blut dann viel mehr CO_2 aufnimmt, weshalb noch kleinere Blutmengen (z. B. 0,05 ccm) zur Analyse ausreichend sind. Bei G. L. wurde (Tab. III) der CO_2-Gehalt bei 18° und 44 mm zu 68,8% gefunden woraus sich ein p_H-Wert von 7,31 nach Hasselbalch berechnet, Aus der Abb. 3 findet man bei 37° den entsprechenden Wert 46,5%, woraus $p_H = 7{,}29$. Inwieweit der Unterschied zufällig ist oder auf Unsicherheiten der Konstanten beruht, ist nicht näher untersucht worden.

Zusammenfassung.

Eine Methode zur Bestimmung der CO_2 des Blutes wird angegeben, wobei 0,25—0,3 ccm Blut bei gewünschter CO_2-Spannung gesättigt werden. Diese Blutmenge genügt zu einer Doppelanalyse der CO_2. Der mittlere Fehler einer solchen Doppelbestimmung beträgt nur ungefähr $\pm 0{,}5$ Vol.-%.

Digitized by Google

Über künstliche Zymogene.

Von

Martin Jacoby.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 1. Februar 1920.)

In mehreren Arbeiten meines Laboratoriums wurde gezeigt, daß es nach verschiedenen Methoden gelingt, Fermente zu inaktivieren und zu reaktivieren. Zum Teil sind die Versuche in anderem Zusammenhange publiziert worden und wohl deswegen weniger beachtet worden. Jedenfalls erscheint es wünschenswert, bevor ich im folgenden in der experimentellen Analyse der Erscheinungen fortfahre, noch einmal einige unserer wichtigsten Ergebnisse zusammenzustellen.

Unsere ältesten Beobachtungen finden sich in einer Arbeit von Hata[1]). Damals hatte sich bereits neben vielen interessanten Einzelbeobachtungen gezeigt, daß man Fermente (Trypsin, Lab, Diastase, Katalase usw.) nach der Sublimat-Inaktivierung auch noch nach längerer Zeit wieder durch Substanzen, wie Cyankalium und Schwefelkalium reaktivieren kann. Interessante Einzelheiten wurden in folgenden 4 Punkten zusammengefaßt:

1. Bei Fermenten, wie Trypsin und Lab, welche in sehr eiweißarmen Lösungen zur Untersuchung gelangen und erst durch große Mengen von Sublimat inaktiviert werden, ist die Reaktivierung nur durch Cyankalium möglich, wobei kein Niederschlag sich bildet. Dagegen geschieht sie nicht durch Schwefelkalium, welches das Quecksilber ausfällt.

2. Bei dem relativ eiweißarmen und durch eine geringe Menge von Sublimat leicht inaktivierbaren Speichel geschieht die Reaktivierung durch Cyankalium als auch durch Schwefelkalium ganz leicht. Durch Abzentrifugieren des durch Sublimat erzeugten

[1]) Diese Zeitschr. **17**, 156. 1909.

Digitized by Google

Niederschlages geht aber ein bedeutender Teil des Fermentes aus der Lösung in den Niederschlag über.

3. Bei eiweißreichem Leberextrakt ist die Reaktivierung sehr leicht zu erreichen. Das proteolytische Ferment wird erst durch eine ziemlich große Sublimatmenge ausgefällt.

4. In fast eiweißfreier Enzymlösung ruft der Zusatz einer zur Inaktivierung nötigen Sublimatmenge keine Trübung hervor. In proteinhaltigen Fermentlösungen, wie Speichel und Leberextrakt, tritt bei demselben Zusatz eine Trübung oder ein bedeutender Niederschlag auf. Wenn der Eiweißgehalt gering ist, so geht ein Teil des Fermentes bei Zentrifugierung in den Niederschlag über. Wenn aber die Eiweißmenge sehr groß ist, so bleibt das ganze Ferment in der Lösung. Erst bei sehr großer Sublimatmenge geht ein Teil des Fermentes in den Niederschlag über.

Die Inaktivierung und die Fällung oder Zustandsänderung des Fermentes durch Sublimat ist also nicht derselbe Vorgang. Bereits damals erkannten wir als die wahrscheinlichste Auffassung der experimentellen Befunde, daß das Sublimat mit den Fermenten Verbindungen eingeht.

In späteren Versuchsreihen[1]) arbeitete ich mit der von mir vielfach herangezogenen Soja-Urease. Auch hier gelang die Sublimat-Inaktivierung und Reaktivierung mit Hilfe von Cyankalium. Die Urease erlaubt ein sehr übersichtliches und exaktes Arbeiten. 1 g der hochwirksamen Urease wurde durch 1 mg Sublimat inaktiviert. Durch nachträgliche Zufügung von Cyankalium wird die Fermentwirkung wiederhergestellt. Instruktiver als die Sublimatversuche waren Versuche über die Einwirkung von Nickel auf die Soja-Urease. Hier ergab sich folgendes:

Brachte ich Ureaselösungen mit Nickeloxydulpulver zusammen und ließ das Metall einige Zeit einwirken, so erhielt ich inaktive Lösungen, welche auch nach scharfer Trennung durch Zentrifugieren und Filtrieren inaktiv blieben, obgleich das Metallpulver völlig aus der Lösung entfernt war. In diesem inaktiven Zustand ließen sich die Lösungen aufbewahren und jederzeit durch Zufügung von Cyankalium oder Glykokoll reaktivieren.

Über das Wesen der Inaktivierung wurde eine Hypothese aufgestellt, die fruchtbare Fragestellungen ergab. Ich nahm an,

[1]) Diese Zeitschr. 76, 275. 1916.

Digitized by Google

daß die inaktivierenden Substanzen (Sublimat, Nickel) mit den Fermentmolekülen komplexe Verbindungen im Sinne Werners bilden, daß also bei den Fermenten eine Valenz wirksam werden kann, welche die Anlagerung des Sublimats oder des Nickels ermöglicht. Diese Vorstellung scheint im Lichte der neuesten Entwicklung noch begründeter als mancher Leser ursprünglich vielleicht geglaubt hat. Denn die Entwicklung der physikalischen Chemie und ihre Anwendung auf biologische Probleme drängt immer mehr dahin, der Wernerschen Valenzlehre eine bedeutsame Rolle für biologisch wichtige Reaktionen einzuräumen.

Um für weitere Betrachtungen eine kurze und praktische Formulierung zu haben, werde ich die inaktivierten Fermente welche ich als Komplexverbindungen auffasse, in Zukunft als künstliche Zymogene bezeichnen. Unter Zymogenen versteht man inaktive Vorstufen von Fermenten, die man durch einfache chemische Eingriffe in aktive Fermente umwandeln kann. Was bei der physiologischen Zymogenaktivierung vor sich geht, ist natürlich nicht genau bekannt. Es liegt mir fern, die Parallele ziehen zu wollen, daß auch dort eine Komplexverbindung gespalten wird. Zwischen beiden Fällen liegt aber jedenfalls die Analogie vor, daß ein inaktives Ferment durch einen chemischen Eingriff aktiviert wird.

Mit den künstlichen Zymogenen habe ich nun neue Versuche angestellt, die zunächst die früher aufgestellte Hypothese auf ihre Richtigkeit prüfen sollten.

Früher hatte ich beobachtet, daß die Inaktivierung der Urease mit Nickeloxydul durch minimale Substanzmengen erfolgt. Um das Ferment zu inaktivieren, muß man zunächst eine ziemlich große Quantität des ungelösten Metalls mit der Fermentlösung zusammenbringen. Aber wirksam sind offenbar nur die geringen Metallspuren, die in Lösung gehen. Denn man kann das ungelöste Metall vollständig aus der Lösung entfernen, und wenn man dann die inaktive Lösung mit den reaktivierenden Agenzien behandelt, so wird sie wieder wirksam. Aus diesen Beobachtungen muß wohl als naheliegendster Schluß abgeleitet werden, daß die zwar hochwirksame aber doch nur spurweise in der Lösung vorhandene Fermentsubstanz mit den ebenfalls in der Lösung befindlichen Metallspuren reagiert.

Digitized by Google

Nun wäre zwischen zwei Möglichkeiten die Entscheidung zu treffen:

1. Das Metall könnte sich mit den Fermentmolekülen verbinden, wobei es zunächst gleichgültig wäre, ob das direkt oder auf dem Umwege über Eiweißkörper, die dem Molekularverbande des Fermentes zugehören, erfolgt.

2. Es wäre möglich, daß das frei in der Lösung befindliche Nickel die Fermentwirkung hindert.

Zur Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten habe ich Dialyseversuche angestellt. Wenn frei in der Lösung vorhandenes Nickel in Frage kommt, so muß man erwarten, daß es bei der Dialyse entfernt wird und daß das Ferment durch die Dialyse manifest wird. Wenn aber die volle Fermentwirkung nicht durch Dialyse herstellbar ist, wohl aber nach Abschluß einer energischen Dialyse die Ureasewirkung noch durch Cyankalium oder Glykokoll wesentlich verstärkt oder erst hervorgerufen werden kann, so spricht das dafür, daß in der Lösung künstliche Zymogene, die als kolloide Nickelverbindungen aufzufassen wären, vorhanden sind. Das ist nun, wie die in der Richtung angestellten Versuche überzeugend beweisen, in der Tat der Fall.

Alle angewandten Nickelpräparate — benutzt wurden Nickel und Nickeloxydul — sind für diese Versuche brauchbar, aber quantitativ verschieden. Die besten Resultate erhielt ich mit einem sehr reinen Nickeloxydulpräparat, das ich schon bei meinen früheren Versuchen benutzt hatte. Aber auch ein neuerdings von Kahlbaum bezogenes Präparat mit der Bezeichnung „Nickeloxydul (kobaltfrei)" war brauchbar.

Versuchsbeispiel.

0,18 g eines gut wirksamen Soja-Urease-Präparates werden in 60 ccm Wasser gelöst. Die Lösung wird filtriert. Man erhält 58 ccm einer schwach opaken, etwas gelblichen Flüssigkeit. Die Lösung wird auf 1 g Nickeloxydul gegossen, 1 ccm Toluol hinzugefügt, das Gemisch durchgerührt und dann über Nacht im Eisschrank aufbewahrt. Am nächsten Tage wird die Flüssigkeit von dem Pulver abgegossen, kräftig zentrifugiert und zweimal filtriert. Man erhält 54 ccm einer leicht opaken Flüssigkeit.

25 ccm werden im Eisschrank aufbewahrt, der Rest, 29 ccm, werden in eine Fischblase gefüllt und 48 Stunden im Eisschrank gegen 200 ccm destillierten Wassers dialysiert.

Digitized by Google

Nach Beendigung der Dialyse ist der Schlauchinhalt stark trübe und setzt einen dicken Niederschlag ab, die Kontrollösung ist klar geblieben.

Nunmehr wird folgender Versuch angesetzt:

1. 10 ccm dialysierte Lösung + 2 ccm Cyankaliumlösung (1 : 1000) = 2 mg Cyankalium;
2. 10 ccm dialysierte Lösung + 2 ccm Wasser;
3. 10 ccm Kontrollösung + 2 ccm Cyankaliumlösung (1 : 1000) = 2 mg Cyankalium;
4. 10 ccm Kontrollösung + 2 ccm Wasser.

Zu allen vier Proben wird je 0,5 ccm Toluol und 20 ccm einer 2 proz. Harnstofflösung getan.

24 Stunden Brutschrank.

Es wurde — ausgedrückt in Kubikzentimeter verbrauchter $^n/_{10}$-Säure Ammoniak gebildet:

1. 36,2; 2. 4,9; 3. 60,7; 4. 6,8.

In einem entsprechenden Versuche war

1. 33,1; 2. 9,0; 3. 64,5.

Aus den Versuchen geht ohne weiteres hervor, daß das Zymogen durch die Dialyse nicht aktiviert wird, sondern noch als solches in der Lösung vorhanden ist. Daß nach der Dialyse weniger Ferment durch Aktivierung manifest wird als vorher in der Lösung war, ist nicht weiter wunderbar. Denn einmal ist vielleicht das Zymogen als solches nicht ganz undialysabel, ferner wird vielleicht bei der Dialyse die Nickelverbindung allmählich irreversibel. Für unsere Frage ist beides unerheblich. Sicher ist jedenfalls, daß Zymogen nach der Dialyse noch reichlich in der Lösung vorhanden ist, woraus zu schließen ist, daß das Ferment mit dem Nickel eine Verbindung eingeht.

Ganz entsprechend, wie mit Cyankalium, lassen sich auch mit Glykokoll die Aktivierungsversuche anstellen, wie wir das schon früher festgestellt hatten. Nunmehr habe ich Versuche angestellt, bei denen das Glykokoll direkt dem Schlauchinhalt zugesetzt wurde. Hier mußte also schon während der Dialyse das Nickel durch das Glykokoll von dem Ferment abgetrennt werden, das Zymogen also in das Ferment verwandelt werden.

Das zeigte sich, indem die dialysierte Flüssigkeit direkt fermentaktiv wurde. Aber darüber hinaus konnte mehr ermittelt werden, indem man die dialysierte Flüssigkeit zum Teil direkt, zum Teil unter Zusatz von Glykokoll auf ihre Fermentwirksamkeit prüfte. Früher hatte ich nämlich mit Umeda gezeigt, daß

Digitized by Google

auch das fertige Ferment in seiner Wirkung durch Aminosäuren wie das Glykokoll verstärkt wird, eine Verstärkung, die mit der Aktivierung des Zymogens nichts zu tun hat. Indem ich nun mit Glykokoll noch eine erhebliche Verstärkung erhielt, war damit bewiesen, daß nicht etwa das Glykokoll trotz der Dialyse noch im Schlauchinhalt zurückgeblieben war. Wäre das der Fall gewesen, so hätte durch weiteren Zusatz von Glykokoll bei der endgültigen Prüfung der Fermentwirkung keine weitere Verstärkung eintreten dürfen, was aber tatsächlich geschieht.

Das Ferment wird also durch Dialyse aktiviert, indem das Glykokoll durch den Schlauch wandert. Es ist also nur möglich, daß das Nickel die Aminosäureverbindung eingeht, dadurch aus dem Zymogen austritt und so der Dialyse verfällt, wodurch das Ferment aktiv wird.

Versuchsbeispiel.

0,18 g desselben gut wirksamen Soja-Urease-Präparates wie das früher verwandte werden in 60 ccm Wasser gelöst. Die Lösung wird filtriert. Man erhält ca. 57 ccm Filtrat. Die Flüssigkeit wird auf 1 g Nickeloxydul gegossen, 1 ccm Toluol hinzugefügt, das Gemisch durchgerührt und über Nacht im Eisschrank aufbewahrt. Am nächsten Tage wird die Flüssigkeit von dem Pulver abgegossen, zentrifugiert und zweimal filtriert. Man erhält ca. 52 ccm eines kaum opaken Filtrats, in dem 1 g Glykokoll gelöst wird. Die Lösung wird im Eisschrank 48 Stunden gegen 200 ccm destillierten Wassers dialysiert. Nach Beendigung der Dialyse ist der Schlauchinhalt trübe und beträgt ca. 54 ccm.

Nunmehr wird folgender Versuch angesetzt:

1. 20 ccm dialysierte Flüssigkeit + 10 ccm Wasser;
2. 20 ccm dialysierte Flüssigkeit + 10 ccm Glykokoll (5 proz.) = 0,5 g Glykokoll;

Zu beiden Proben kommt je 0,5 ccm Toluol und 20 ccm Harnstoff (2 proz.).

24 Stunden Brutschrank.

Es wurde Ammoniak gebildet:

1. 79,3; 2. 110,9.

Nachdem die von mir dargestellten künstlichen Zymogene nunmehr in ihrem Wesen etwas näher bekannt geworden sind, wird es notwendig sein, einen Vergleich der Eigenschaften der künstlichen Zymogene und der Fermente experimentell durchzuführen. Mir schwebt dabei das Ziel vor, die Isolierung der Fermente auf dem Umwege über die Zymogene zu fördern. Eine Aussalzung oder Ausfällung der künstlichen Zymogene ist

Digitized by Google

mir bisher noch nicht gelungen. Beim Kochen wird das künstliche Zymogen dauernd inaktiv. Jedenfalls unterliegt es keinem Zweifel, daß auf dem neubeschrittenen Wege Fortschritte zu erreichen sein werden.

Zum Schluß sei nochmals ausdrücklich betont, daß die „künstlichen Zymogene" keineswegs als Modelle der natürlichen Zymogene angesehen werden können. Daß aber komplexen Verbindungen eine wichtige physiologische Rolle zukommt, geht auch wieder aus den schönen Untersuchungen von Löffler und Spiro[1]) mit Klarheit hervor.

[1]) Über Wasserstoff- und Hydroxylionengleichgewicht in Lösungen. — I. u. II. Mitteilung. — Helvetica Chimica Acta 2, H. 4 u. 5. 1919.

Digitized by Google

Autorenverzeichnis.

Adolf, Mona und Spiegel, Ernst. Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide. XXIII. Das Acidalbumin. S. 175.

Fex, Johan. Chemische und morphologische Studien über das Cholesterin und die Cholesterinester in normalen und pathologisch veränderten Organen. S. 82.

v. Hoefft, Franz. Calorimetrische Untersuchungen an Melaninen. S. 1.

Iversen, Poul. Untersuchungen über die titrimetrische Phosphorsäurebestimmung nach Neumann. S. 15.

— — Zur Bestimmung des Phosphorgehalts kleinerer Mengen von Blut und Plasma. S. 22.

Jacoby, Martin. Über künstliche Zymogene. S. 316.

Koritschoner, Robert und Morgenstern, Otto. Refraktometrische Untersuchungen über die Reaktionen zwischen isolierten Krebszellen u. Blutserum (Freund-Kaminersche Reaktionen). I. Mitteilung. S. 259.

Krogh, A. und Liljestrand, G. Eine Mikromethode zur Bestimmung der Kohlensäure des Blutes. S. 300.

Landsteiner, Karl. Spezifische Serumreaktionen mit einfach zusammengesetzten Substanzen von bekannter Konstitution (organischen Säuren). XIV. Mitteilung über Antigene und serologische Spezifität. S. 280.

Lüers, Heinrich. Studien über die Reifung der Cerealien. S. 30.

Mándoki, L. und Polányi, M. Ursachen der Leitfähigkeit von Caseinlösungen. S. 254.

Murschhauser, Hans. Das optische Drehungsvermögen der Dextrose unter dem Einfluß von Salz- und Schwefelsäure. I. Mitteilung. S. 214.

Němec, Antonin und Strañák, František. Beitrag zur Kenntnis des toxischen Einflusses der Terpene auf die höheren Pflanzen. S. 200.

Polányi, M. Studien über Leitfähigkeitserniedrigung und Adsorption durch lyophile Kolloide. S. 237.

Rusznyák, Stefan. Chinin und Blut. I. Mitteilung. Ein Beitrag zur Pathogenese des Schwarzwasserfiebers. S. 9.

Wagner, Richard. Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide. XXIV. Die Fällung von Eiweiß durch Säuren und Laugen. S. 190.

Digitized by Google

Digitized by Google
12 7693

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

ST.

Digitized by Google